

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Définition du domaine minimal d'interaction de partenaires de CED-9 au sein du module apoptotique de C.elegans par l'analyse en test double-hybride d'une collection systématique de leurs fragments

Laloux, Géraldine

Award date:
2005

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**DEFINITION DU DOMAINE MINIMAL D'INTERACTION DE PARTENAIRES DE CED-9 AU SEIN DU
MODULE APOPTOTIQUE DE C. ELEGANS PAR L'ANALYSE EN TEST DOUBLE-HYBRIDE D'UNE
COLLECTION SYSTEMATIQUE DE LEURS FRAGMENTS**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Géraldine LALOUX
Juin 2005

Définition du domaine minimal d'interaction de partenaires de CED-9 au sein du module apoptotique de *C. elegans* par l'analyse en test double-hybride d'une collection systématique de leurs fragments

LALOUX Géraldine

Résumé

Les fonctions cellulaires complexes sont probablement accomplies suite à une variété de connexions entre modules ou machineries moléculaires au sein d'un réseau interactomique. Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à une portion de l'espace protéique susceptible de contenir un de ces modules, constitué par des protéines ayant un rôle connu ou supposé dans l'apoptose chez *C. elegans*. Dans le but de comprendre le fonctionnement du sous-réseau d'intérêt, nous avons analysé les « liens » en jeu au niveau des domaines d'interaction. Les interactions entre CED-9 (équivalent de Bcl2) et trois partenaires, CED-4, F25F8.1 et SPD-5 (impliquée dans la formation du fuseau mitotique), ont été investiguées. Pour déterminer les domaines nécessaires pour l'interaction avec CED-9 pour ces trois protéines, celles-ci ont été soumises à une fragmentation systématique, suivie, pour chaque peptide généré, d'un test d'interaction en double-hybride contre CED-9. La conception de la collection de fragments pour chaque protéine d'intérêt est telle qu'ils sont générés (par PCR et clonage dans le système GATEWAY™) et organisés en matrice, telle que chaque position est indicatrice d'un fragment de longueur donnée. Cette disposition étant maintenue pour les tests d'interaction, le domaine minimal d'interaction avec CED-9 (DMI) de CED-4, F25F8.1 et SPD-5 a pu être déterminé. De plus, le domaine minimal d'homodimérisation (DMH) de F25F8.1 a pu être défini par cette même approche. À terme, les DMI pourront être utilisés comme dominants négatifs pour la perturbation spécifique d'interactions *in vivo*. Le phénotype lié à la perte du « lien » SPD-5-CED-9 sera d'un intérêt tout particulier puisque reflétant le découplage entre l'apoptose et la mitose.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur: J. Vandenhoute ; **Co-promoteur :** M. Vidal

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. M. Vidal, co-promoteur de ce mémoire, pour m'avoir permis de réaliser toute la partie expérimentale dans son laboratoire à Boston.

J'adresse un tout grand merci au Professeur J. Vandenhoute, promoteur du mémoire, pour m'avoir communiqué le goût de la biologie moléculaire depuis la deuxième candidature, et évidemment pour m'avoir donné l'opportunité de la découvrir sous un angle peu ordinaire dans le contexte de ce mémoire à Boston.

Un merci tout particulier à l'« Apoptosis Team » qui m'a encadrée tout au long de cette aventure :

Pierre-Olivier, pour sa grande patience, son calme et sa gentillesse.

Matija, un peu moins calme (the monkey), pour son aide au labo, le « brunch » et sa contribution aux corrections du manuscrit.

Enfin mais non des moindres, Stuart (thanks a lot from « Laylox » !)

Merci à tous les autres membres du Vidal lab pour leur accueil et leur sympathie. Bon courage si vous mangez toujours à la cantine.

Je pense également à tous les « Bio 2004-2005 » ainsi qu'aux URBMiens !

Je tiens à féliciter Maxime pour m'avoir supportée et soutenue moralement pendant les trois mois à Boston.

Merci à tous ceux qui m'ont encouragée à (très longue) distance : Lise-Marie, Marie, Marie-Céline, les Céline(s) (suite logique), etc... avec une mention spéciale pour Benoît, mes parents et mon frère pour m'avoir soutenue en toutes circonstances.

Messieurs T. Arnould, X. De Bolle, R. Hallez et P. O. Vidalain, membres du jury, je vous remercie d'avance pour le temps que vous allez consacrer à la lecture critique de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	1
-------------------	---

INTRODUCTION

1. DU « GENE » AU « MODULE » COMME UNITE FONCTIONNELLE.....	2
« Qu'est-ce qu'un gène, qu'est-ce qu'une fonction ? »	2
« Ère post-génomique et biologie des systèmes »	2
« Cartes d'interactions et modules fonctionnels »	3
« Highways et liens entre machines moléculaires »	4
2. UN RESEAU DANS LE RESEAU : LA MACHINERIE APOPTOTIQUE DE <i>C. ELEGANS</i>.....	5
2.1. Importance physiologique	5
2.1.1. Mort cellulaire lors du développement somatique	6
2.1.2. Apoptose dans la lignée germinale	6
2.2. Voie centrale d'exécution	7
2.2.1. Les acteurs centraux.....	7
2.2.2. L'exécution.....	7
2.3. L'apoptose germinale et l'apoptose somatique se distinguent par l'intégration des signaux.....	8
2.3.1. Trois voies génétiques distinctes (au moins) conduisent à l'apoptose dans la lignée germinale	8
2.3.2. Régulation de l'apoptose somatique lors du développement	9
2.4. Une « highway moléculaire » relie les modules apoptotique et mitotique.	10
2.4.1. Identification d'un lien entre deux modules.....	10
2.4.2. SPD-5 est requise pour l'assemblage et la maturation du fuseau mitotique chez <i>C. elegans</i>	10
2.4.3. Approches pour l'établissement du rôle de « highway » entre modules apoptotique et mitotique	11
3. APPROCHE « CED-9-CENTREE »	12
3.1. Perturbation du réseau.....	12
3.2. Sélection d'allèles « edgétiques »	12
4. APPROCHE « INTERACTEURS-CENTREE ».....	14
4.1.1. Les domaines comme unités fonctionnelles de base	14
4.1.2. Domaines conformationnels, domaines séquentiels	15
4.1.3. Intérêt des domaines pour l'étude des interactions protéine-protéine	15
5. OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL	16

RESULTATS

1. ANALYSE DE DOMAINES PAR FRAGMENTATIONS SYSTEMATIQUES	17
1.1. Description générale du concept	17
1.2. « Design » de matrices de délétions	18
2. GENERATION D'UNE RESSOURCE CENTRALE « FRAGMENTOME ».....	20
2.1. Clonage des fragments PCR	20
2.1.1. Système de clonage GATEWAY™ : principe et avantages	20
2.1.2. Clonage des fragments en vecteurs d'entrée.	22
2.2. Disponibilité de la ressource en tant qu'outil.....	22
3. UTILISATION DE FRAGMENTOMES POUR L'ANALYSE DU SOUS-RESEAU APOPTOTIQUE DE LA LIGNEE GERMINALE DE <i>C. ELEGANS</i>.....	23
3.1. Question posée pour une étude « interacteurs-centrée »	23
3.2. Identification des DMI par double hybride.....	23
3.2.1. Stratégie	23

3.2.2.	Clonage de la ressource d'entrée en vecteur AD	23
3.2.3.	Tests des interactions	24
3.2.3.1.	Co-expression en levure	24
3.2.3.2.	Mise en évidence des interactions	24
3.2.3.3.	Identification des fragments auto-activateurs	24
3.2.3.4.	Détermination des DMI	25
a.	DMI de SPD-5	25
b.	DMI de CED-4	26
c.	DMI de F25F8.1	27

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1.	DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS	28
1.1.	<i>Preuves de principe</i>	28
1.2.	<i>Pertinence biologique</i>	29
1.2.1.	Faux positifs	29
1.2.2.	Caractère exhaustif de l'analyse	29
1.2.3.	Questions de stabilité et de conformation des fragments	30
1.3.	<i>Retour à la question de fonction</i>	31
1.4.	<i>Deux catégories de domaines sont définies à partir des DMI mis en évidence</i>	31
2.	PERSPECTIVES	33
2.1.	Prérequis à l'obtention d'une carte des domaines pour le module apoptotique	33
2.2.	<i>Application de l'approche « interacteurs-centrée » plus loin dans le réseau : expérience préliminaire</i>	33
2.3.	<i>Validation des DMI en dehors du système double-hybride conventionnel</i>	34
2.3.1.	Vérification de la spécificité du DMI pour l'interaction analysée	34
2.3.2.	Les DMI comme outil pour des études édégétiques in vivo	34
2.4.	<i>Perturbations du module apoptotique dans le contexte de la relation hôte-parasite</i>	35

MATERIELS ET METHODES

1.	PROTOCOLES	36
1.1.	<i>Clonage des ORFs</i>	36
1.1.1.	Design des amorces	36
1.1.2.	PCR (Réaction en Chaîne de la Polymérase)	36
1.1.2.1.	Protocoles :	36
1.1.2.2.	Programme :	37
1.1.3.	Réactions GATEWAY™	37
1.1.3.1.	Réaction BP	37
1.1.3.2.	Réaction LR	38
1.1.3.3.	Miniprep	38
1.1.4.	Migration sur gel	38
1.2.	<i>Transformations</i>	39
1.2.1.	Transformation de bactéries CaCl ₂ compétentes	39
1.2.2.	Transformations de levures	39
1.3.	<i>Tests des interactions</i>	40
1.3.1.	Principe du double-hybride en levure	40
1.3.2.	Test β-Galactosidase (Walhout <i>et al.</i> , 2001)	41
1.3.3.	Test de croissance sur milieu Sc –Leu –Trp –His +3AT	41
1.3.4.	Contrôles du double-hybride en levure	41
1.4.	<i>Crible double-hybride en levure</i>	42
1.5.	<i>Séquençage</i>	42
1.5.1.	Purification des produits PCR	42
1.5.2.	Réactions de séquençage	43
1.5.3.	Analyse des séquences	43
1.6.	<i>Lyse des levures</i>	43

2. SOUCHES	43
2.1. <i>Levures</i>	43
2.2. <i>Bactéries</i>	43
3. MILIEUX	43
3.1. <i>Milieux pour levures</i>	43
3.1.1. Milieux sélectifs.....	44
3.1.2. Milieux non sélectifs (YEPD : yeast extract bacto-peptone D-glucose)	44
3.1.2.1. Solide (2 L).....	44
3.1.2.2. Liquide (2 L).....	44
3.2. <i>Milieux pour bactéries</i>	44
3.2.1. Milieu LB (Luria-Bertani).....	44
3.2.2. Milieu S.O.C. (Invitrogen, Cat.No.15544-034).....	45
3.3. <i>Réactifs</i>	45
3.3.1. TE/LiAc	45
3.3.2. PEG/TE/LiAc	45
3.3.3. Glucose 40% (w/v)	45
3.3.4. Acides aminés	45
3.3.4.1. Solutions concentrées d'acides aminés	45
3.3.4.2. Poudre d'acides aminés	45

BIBLIOGRAPHIE

INDEX DES FIGURES

INTRODUCTION

- Fig. 1 : Émergence de nouvelles propriétés à partir des composants.
Fig. 2 : Carte de l'interactome de *C. elegans* (Li *et al.*, Science 2004).
Fig. 3 : Les composants cellulaires sont organisés en modules fonctionnels.
Fig. 4 : Concept de « highway moléculaire ».
Fig. 5 : Réseau d'interactions entre les protéines impliquées dans l'apoptose chez *C. elegans*.
Fig. 6 : Schéma des gonades de *C. elegans*.
Fig. 7 : Voie d'exécution de l'apoptose chez *C. elegans*.
Fig. 8 : Modèle pour l'apoptose induite par un dommage à l'ADN dans la lignée germinale femelle.
Fig. 9 : La liaison d'EGL-1 induit des réarrangements de structure importants sur CED-9.
Fig. 10 : Résumé des voies de régulation conduisant à l'apoptose physiologique des cellules germinales et somatiques chez *C. elegans*.
Fig. 11 : Résultats du crible double-hybride pour l'identification des interacteurs impliqués dans l'apoptose.
Fig. 12 : *spd-5* est en relation avec l'apoptose.
Fig. 13 : *spd-5* est nécessaire pour la migration pronucléaire, l'assemblage du fuseau mitotique et la division cellulaire.
Fig. 14 : Représentation schématique de l'interaction entre les modules fonctionnels « mitose » et « apoptose ».
Fig. 15 : Approche CED-9 centrée.
Fig. 16 : Perturbations affectant les nœuds ou les liens du réseau.
Fig. 17 : Principe de sélection des IDAs de CED-9.
Fig. 18 : Principe de la méthode de sélection des allèles CED-9 (*ida*^{EGL-1}).
Fig. 19 : Les résidus mutés des IDAs de CED-9 qui disruptent uniquement l'interaction avec CED-4, SPD-5 ou F25F8.1 se localisent sur différentes régions de la structure de CED-9.
Fig. 20 : Résumé des liens établis entre les nœuds du sous-réseau étudié.
Fig. 21 : Approche interacteurs-centrée.
Fig. 22 : Exemples de protéines à domaines séquentiels (continus) ou conformationnels (discontinus).
Fig. 23 : Exemple d'utilisation des domaines dans un réseau.

RESULTATS

- Fig. 1 : Illustration du concept de matrice de délétions.
Fig. 2 : Schéma des réactions de recombinaison du système de clonage GATEWAY™.
Fig. 3 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de SPD-5 et CED-9-DB.
Fig. 4 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de CED-4 et CED-9-DB.
Fig. 5 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de F25F8.1 et CED-9-DB.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- Fig. 1 : Cartographie des domaines de CED-4.
Fig. 2 : Cartographie des domaines d'homodimérisation de TIR-1 et d'interaction de TIR-1 avec KGB-1.
Fig. 3 : Schéma d'explication hypothétique de discontinuité dans les résultats double-hybride.
Fig. 4 : Le modèle de la pierre de Rosette.

Fig. 5 : Le fragment de CED-4 dispensable à l'interaction avec CED-9 (résidus 1 à 80) correspond pratiquement au domaine CARD (résidus 7 à 90).

Fig. 6 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de F25F8.1 et F25F8.1-DB.

Fig. 7 : Résumé des DMI et DMH mis en évidence.

Fig. 8 : Perturbation *in vivo* de l'interaction CED-9-SPD-5 par la surexpression du DMI de SPD-5.

ABRÉVIATIONS COURANTES

3AT : 1, 2, 4-triaminotriazole

aa : acide aminé

AD (Activation Domain) : domaine de transactivation du facteur de transcription Gal4p

ADNc : ADN complémentaire

co-AP : co-purification d'affinité

C-terminal : extrémité carboxy-terminale

D. O. : densité optique

DB (DNA Binding) : domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p

ddH₂O : eau désionisée et distillée

dH₂O : eau distillée

DMH : domaine minimal d'homodimérisation

N-terminal : extrémité amino-terminale

DMI : domaine minimal d'interaction

dNTPs : déoxynucléosides triphosphates

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

IDA : interaction defective allele, allèle défectif pour une interaction

ORF : open reading frame, phase ouverte de lecture : portion de séquence d'ADN qui débute au codon d'initiation (ATG, méthionine) et finit au codon « Stop ».

pb : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction, réaction en chaîne de la polymérase

PEG : polyéthylèneglycol

rpm : rotations par minute

R-Y2H : reverse double-hybride

Sc : synthétique complet

β-Gal : β-galactosidase

TE : Tris-EDTA

X-Gal : 5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β-D-galactopyranoside

Y2H : yeast two-hybrid, double-hybride en levure

AVANT-PROPOS

L'élucidation de la séquence d'un génome humain en 2001 a eu au moins un double-effet (Venter *et al.*, 2001 ; International Human Genome Sequence Consortium, 2001). La ressource ainsi disponible allait faciliter toutes les approches du génie génétique, en particulier à haut-débit. Paradoxalement, et de manière inattendue, ce progrès de la génétique allait ébranler davantage encore le concept fondateur de la discipline : le gène. Le génome devait être le « blueprint » de l'organisme vivant, en ce sens que la collection des gènes devait permettre de comprendre chacune des fonctions, et par là le fonctionnement intégré de l'organisme. Or il est apparu assez vite qu'il n'en serait rien. La définition de début et de fin d'« un » gène se révélait ardue. De plus, le nombre réel des gènes contenus dans le génome semblait incertain, et trop réduit pour rendre compte de la complexité biologique. Entre les évaluations du nombre de gènes faites avant 2001 qui oscillaient entre 100000 et 250000, et les dernières en date aujourd'hui - environ 25000 (International Human Genome Sequence Consortium, 2004), il y a une réduction de près d'un facteur dix. La conclusion qu'on peut en tirer est que la relation entre les fonctions et même les protéines, et le concept de gène, univoque à l'époque du « cistron », est à reconsidérer.

La problématique dans laquelle se situe ce travail est donc celle de la relation entre les gènes et leurs produits et le phénotype, puisque, comme évoqué ci-dessus, le gène isolé ne satisfait plus au concept d'unité fonctionnelle. Il s'agit d'un enjeu central de la post-génomique ou physio-génomique. Une fois ce point explicité, suivra une présentation de notions utiles à la dissection fonctionnelle de cartes d'interactions protéiques. Enfin, nous introduirons la stratégie que nous suivrons pour revisiter la relation gène-fonction sous cet angle protéomique, après avoir exposé le mécanisme biologique particulier auquel notre recherche s'adresse.

1. Du « gène » au « module » comme unité fonctionnelle

« Qu'est-ce qu'un gène, qu'est-ce qu'une fonction ? »

La relation « gène-peptide-fonction » a été fondatrice de la génétique biochimique, de la génétique moléculaire et du génie génétique. Le terme « cistron » marque la volonté de simplifier, à l'aide d'une définition opérationnelle et univoque, la complexité des relations entre le caractère et son (ou ses) déterminant(s) génétique(s). Les 25000 « gènes » - en réalité les 25000 ORFs détectées *in silico* et sur base de données d'EST - que l'on dénombre dans le génome d'un métazoaire tel l'homme, ne suffisent pas à rendre compte du nombre de protéines, probablement plusieurs centaines de milliers, ni du nombre de « caractères » observés.

Une partie de la réponse à ce paradoxe est à rechercher dans le support de l'information, soit l'ADN ou son ARN homologue. En effet, plusieurs séquences informatives peuvent être obtenues à partir d'une même « portion » d'ADN dans le génome. À titre d'exemple, rappelons l'existence de promoteurs et de terminateurs alternatifs, mais aussi d'épissages alternatifs et autres maturations au niveau du transcrit, sans compter les cas de « DNA splicing », « DNA jumping » ou « DNA switching ». Ces mécanismes sont donc susceptibles de donner lieu, au départ d'un même ADN, à des combinaisons de séquences distinctes en termes de signaux de régulation et/ou de contenu informatif protéique et/ou ARN.

Une autre partie de la réponse est à rechercher dans ce qu'il advient non de l'ADN mais du produit final de son expression. En effet, si on considère un produit de traduction donné, la fonction de celui-ci n'est pas définie de manière univoque, puisqu'il existe des modifications de structure, covalentes ou non, suite à l'action d'agents chimiques ou physiques. Ainsi, le substrat conditionne la fonction d'une enzyme. De nombreux ligands, protéiques ou non, affectent l'état fonctionnel d'un peptide. C'est le cas des assemblages protéiques homo- ou hétéro-multimériques, des interactions ligand-récepteur et d'innombrables mécanismes d'interactions plus ou moins brèves ou d'assemblages conditionnant la fonction d'un produit de traduction. Nous reviendrons plus loin sur ce concept d'émergence d'une fonction par l'assemblage physique et/ou l'établissement de cascades d'interactions entre composants.

On voit qu'isoler conceptuellement un gène et sa fonction est une simplification. En effet, aucun gène, aucune protéine ne « fonctionne » sans l'interaction avec des acteurs divers. Dans ce qui suit, nous évoquons un point de vue nouveau amené par l'ère post-génomique, qui consiste à partir des relevés des interactions existant dans un organisme donné, et de poser des questions nouvelles à partir des cartes ainsi générées.

« Ère post-génomique et biologie des systèmes »

La disponibilité croissante de séquences complètes de génomes permet de poser de nouvelles questions biologiques. En effet, l'approche réductionniste qui consiste à perturber un gène à la fois pour en déterminer la fonction peut - et probablement doit - maintenant être complétée par des approches plus globales et intégratives qui considèrent de nombreux gènes à la fois. Comme évoqué plus haut, on se rend compte que, plus que des acteurs protéiques et /ou nucléiques isolés, ce sont des réseaux complexes d'interactions entre eux qui régulent des processus biologiques. Dès lors, de telles approches globales devraient améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la biologie des systèmes (Vidal, 2001). Plus précisément, il est intéressant de comprendre comment des composants, par exemple des gènes et des protéines, sont organisés pour permettre l'émergence d'une voie de régulation ou d'une machine moléculaire, accomplissant des fonctions plus complexes que si on en considère les composants isolés (Uetz & Finley, 2005 ; Hartwell *et al.*, 2004) (Fig. 1).

« Cartes d'interactions et modules fonctionnels »

L'appréhension systémique de tout processus biologique nécessite une carte des relations entre les différents acteurs impliqués. Le début de l'ère post-génomique a ainsi été marqué, notamment, par l'établissement de cartes d'interactions physiques entre protéines (ou interactome), et ce pour plusieurs organismes, dont le nématode *Caenorhabditis elegans* (Li *et al.*, 2004). Ces cartes comportent un ensemble de « nœuds » et de « liens », les nœuds représentant les protéines, et les liens les interactions physiques entre ces dernières (Fig. 2). Alors que nous sommes face à ce nombre impressionnant d'interactions, une question essentielle qui se pose aujourd'hui est de savoir de quelle manière utiliser ces données de façon à en déduire des informations qui ont un sens biologique.

Puisqu'une fonction biologique donnée peut rarement être attribuée à une molécule individuelle et que la plupart des fonctions biologiques découlent d'interactions entre de nombreux composants, la question revient à savoir comment inférer les fonctions sous-jacentes d'une carte qui semble « muette » à cet égard. Rappelons néanmoins que, par rapport aux cartes d'interactomes dont nous parlons ici, les cartes représentant d'autres types de relations (épistatiques, de régulation transcriptionnelle, entre métabolites, etc...) sont certainement plus riches en informations. Dans ces derniers cas, la directionnalité ou le « sens » donné aux liens peut être connu et schématisé sous forme de flèches.

À partir des cartes d'interactions physiques de type double-hybride, il s'agira donc de s'élever à un niveau supérieur plus riche en informations fonctionnelles. Pour cela, on peut être amené à supposer que les fonctions y sont encryptées sous forme de petits réseaux ou modules qu'il faudra reconnaître, passant ainsi de la biologie moléculaire à la biologie modulaire (Hartwell *et al.*, 1999). Un module est généralement défini comme un groupe de protéines assurant une fonction de manière semi-autonome et souvent caractérisé par une densité d'interactions ou de liens intra-modulaires plus élevée que celle observée entre modules (Fraser *et al.*, 2005). Par exemple, dans le système de transduction du signal qui, chez la levure, convertit la détection d'une phéromone en « mating », ce n'est pas une protéine isolée qui est responsable de l'amplification du signal fourni par la phéromone, mais bien une série de protéines intervenant en cascade, souvent par interactions plus ou moins durables, leur ensemble constituant un module fonctionnel. Dès lors, nous pouvons considérer ces « modules fonctionnels » comme un niveau critique de l'organisation biologique (Xiong & Ferrell, 2003) Accomplissant des fonctions précises qui résultent des interactions entre leurs composants (protéines, ARN, ADN et métabolites), et non réductibles aux propriétés individuelles de ceux-ci, un module fonctionnel est donc défini comme une entité dont la fonction est individualisable par rapport à celle des autres modules. Ce caractère individuel du module peut reposer sur son organisation en une structure isolable spatialement ou fonctionnellement. Un ribosome peut parfaitement illustrer le premier cas, puisque les réactions impliquées dans la synthèse des protéines sont concentrées en une particule unique, isolant spatialement sa fonction. Par contre, une voie de transduction du signal (par exemple responsable de la chimotaxie chez les bactéries, du « mating » chez les levures, ou de la voie de signalisation TGF β chez *C. elegans*) est un module « étendu » spatialement, isolé par la spécificité de liaison du signal chimique (par exemple, un chémo-attractant, une phéromone ou un facteur de croissance) à la protéine réceptrice, et des interactions entre les différentes protéines de la voie de signalisation dans la cellule (Fig. 3) (Tewari *et al.*, 2004). Notons qu'on peut concevoir des voies de biosynthèse dont les agents seraient rapprochés spatialement dans un ordre reflétant l'enchaînement des étapes fonctionnelles, par exemple enzymatiques, de cette voie (la chaîne de transport d'électrons localisée en membranes mitochondriales en est une illustration).

On voit que les fonctions cellulaires peuvent être appréhendées par l'étude du fonctionnement de ces modules. Le point de départ sera dès lors fourni par les données de la carte d'interactions physiques du protéome de l'organisme donné, les modules étant comparables à des sous-réseaux dans ce plus grand réseau qu'est l'interactome.

« Highways et liens entre machines moléculaires »

Un module n'est pas une structure figée : un composant peut appartenir à divers modules, à divers moments et la fonction d'un module peut être soumise à une régulation. En effet, on peut imaginer un changement de fonction d'un module, suite à un signal provenant par exemple d'un autre module. Ceci illustre le fait que les « gènes » et *a fortiori* les « réseaux » génétiques et protéiques répondent bien entendu à des signaux moléculaires de l'environnement extérieur, mais à leur tour peuvent entraîner une modification du milieu intérieur, laquelle retentira sur d'autres gènes ou réseaux. Les fonctions cellulaires complexes seraient alors accomplies suite à l'établissement de différentes connexions entre modules (Fig. 4a). Par exemple, le « super-module » dont la fonction est de distribuer précisément les chromosomes-fils aux cellules-filles lors de la mitose, comprend entre autres le module responsable de l'assemblage du fuseau mitotique, un module qui permet l'alignement des chromosomes sur le fuseau, et un oscillateur cellulaire qui régule les transitions entre interphase et mitose (Hartwell *et al.*, 1999). Une « circuiterie » complexe serait responsable d'une grande variété de « read-outs » et donc de phénotypes.

Le point de vue modulaire des fonctions cellulaires est renforcé par l'idée que ces structures, en alternant leurs connexions, permettent des changements dans les propriétés et les fonctions d'une cellule, et par là même, favorisent l'évolution et l'adaptation. En limitant l'effet du changement d'une protéine X à un module, et en permettant aux modules d'être connectés entre eux par des protéines individuelles, il devient facile de modifier la fonction de la protéine X sans affecter toutes les propriétés de la cellule. On observe en effet que les « hubs » inter-modulaires sont plus « sensibles » aux perturbations génétiques diverses que ne le sont les « hubs » intra-modulaires, un « hub » étant un nœud fortement connecté (nombreux interacteurs). Par contre, la plasticité des « hubs » inter-modulaires est remarquable en ce sens que la versatilité des nœuds et interactions impliqués entre modules est plus fréquente qu'en situation intra-modulaire (Fraser, 2005). Ceci s'explique au plan évolutif : une plus grande contrainte serait imposée aux « hubs » intra-modulaires, pour assurer le maintien de la fonction du module, tandis que les « hubs » inter-modulaires évolueraient plus vite, favorisant la combinatoire évolutive. Les « party hubs » décrits par Han *et al.* (2004) sont des nœuds fortement connectés interagissant avec leurs partenaires au même moment et au même endroit, pouvant ainsi correspondre aux « hubs » intra-modulaires. Par opposition, les « date hubs » sont à rapprocher des « hubs » inter-modulaires. Un « date hub » étant un nœud connecté à ses interacteurs à des moments et/ou des localisations différents, ce concept rend compte des possibilités de modifications de connexions entre modules (Fig. 4b). On peut parler d'« autoroutes moléculaires » ou « highways » pour de telles voies de connexion entre deux modules. Celles-ci passent obligatoirement par deux nœuds propres à chaque module et éventuellement par un ou plusieurs nœuds intermédiaire, établissant la connectivité entre les modules (Fig. 4c). Rappelons qu'il s'agit ici de concepts associés à des modèles topologiques, élaborés pour faciliter les premières étapes de « dissection » d'un réseau afin d'en décrypter les fonctions. Un concept comme celui de « highway moléculaire » rend donc compte des connexions possibles entre sous-réseaux pour assurer un niveau supérieur de complexité, même si la définition de « highway » en tant que telle peut ne pas être univoque (lien « simple » entre nœuds propres à chaque module ou faisant intervenir des nœuds intermédiaires).

2. Un réseau dans le réseau : la machinerie apoptotique de *C. elegans*

Comme déjà évoqué plus haut, l'interactome sous sa représentation de nœuds et de liens semble très complexe. Sa décomposition en modules fonctionnels devrait permettre d'en extraire des informations biologiques dans la mesure où des tels sous-réseaux ou modules correspondent effectivement à des machineries moléculaires. De plus, appréhender le fonctionnement de machines moléculaires à partir des interactions physiques qui existent entre leurs acteurs protéiques fournira certainement des données complémentaires à celles obtenues par les techniques biochimiques ou génétiques « classiques ».

Dès lors, nous nous focalisons dans la suite de ce travail sur une portion de l'espace protéique que constitue l'interactome de *C. elegans*, susceptible de contenir un de ces modules (Fig. 5). Il s'agit de protéines connues pour ou supposées jouer un rôle dans l'apoptose, et les interacteurs double-hybride de celles-ci. L'apoptose, également étudiée sous les termes de « mort cellulaire programmée » ou « suicide cellulaire », a été mise en évidence pour la première fois chez *C. elegans* (Brenner, Horvitz et Sulston, Prix Nobel de Médecine et Physiologie 2002), dans le cadre des observations sur les lignages cellulaires. C'est un mécanisme complexe et encore mal compris dans tous ses détails. L'utilisation d'un modèle eucaryote pluricellulaire tel que *C. elegans* facilite l'émission d'hypothèses quant au fonctionnement de l'apoptose chez les mammifères, et en particulier chez l'homme, puisque de nombreuses homologues (structurales et génétiques) ont été constatées. Les paragraphes qui suivent ont pour but de situer cette « machinerie moléculaire » dans son contexte physiologique et de faire le point sur les dernières avancées dans l'étude de ce sous-réseau, avant de nous y intéresser par une approche originale.

2.1. Importance physiologique

Les métazoaires disposent d'un programme de mort cellulaire constituant une voie génétique et biochimique essentielle, comme il existe un programme de réplication de l'ADN ou de division cellulaire. Ce paragraphe a pour but d'évoquer brièvement les divers rôles physiologiques attribués à l'apoptose chez les métazoaires avant de s'intéresser plus particulièrement au cas de *C. elegans* dans la suite de ce travail.

L'apparition, lors de l'évolution, de types cellulaires différenciés peut avoir nécessité le contrôle de la mort aussi bien que de la division. L'apoptose durant le développement embryonnaire et larvaire contribue à assurer la réussite de l'organogenèse et la formation de tissus complexes. En effet, l'apoptose peut s'avérer une étape indispensable au remodelage, voire à la disparition, de certains tissus, organes, ou membres lors du développement. À titre d'illustration, chez de nombreux vertébrés, la séparation des doigts lors du développement embryonnaire nécessite la régression des interdigitations, réalisée par un mécanisme apoptotique (Garcia-Martinez *et al.*, 1993). La maturation du système immunitaire fait également intervenir l'apoptose, notamment lors la sélection négative reposant sur le répertoire des récepteurs des lymphocytes T immatures (Smith *et al.*, 1989). Ceux-ci meurent en cas de reconnaissance d'épitopes du « soi » dans le thymus. Lors de la métamorphose chez les amphibiens, l'apoptose est responsable, notamment, de la résorption de la queue du têtard (Rowe *et al.*, 2005).

L'apoptose est également fonctionnelle chez les organismes adultes en maintenant l'homéostasie cellulaire. C'est particulièrement le cas pour des organismes qui doivent intégrer de nombreux signaux physiologiques ou pathologiques, dont la régulation de la réponse aux agents infectieux. Des modèles de perte ou de gain de fonction pour des gènes de

la voie apoptotique indiquent que la perte de l'homéostasie cellulaire peut être un événement pathologique résultant en diverses maladies. Par exemple, une apoptose insuffisante peut se manifester par un cancer ou de l'auto-immunité, alors qu'une mort cellulaire exagérée peut donner lieu à des maladies dégénératives chroniques, l'infertilité ou une immunodéficience (Danial & Korsmeyer, 2004).

Les manifestations de l'apoptose sont multiples et s'observent à différents niveaux (ADN, organites, membranes, etc...), avec pour conséquence la mort de la cellule et son élimination. La cellule étant fragmentée en corps apoptotiques entourés d'une membrane, il n'y a pas de libération de cytokines pro-inflammatoire dans l'environnement immédiat. De plus, les corps apoptotiques sont phagocytés par les cellules voisines.

Chez *C. elegans*, deux vagues de morts apoptotiques ont été mises en évidence. La première a lieu en grande partie durant l'embryogenèse ; la seconde se produit dans la lignée germinale femelle chez l'adulte hermaphrodite, où des centaines de cellules sont éliminées au cours de l'oogenèse.

2.1.1. Mort cellulaire lors du développement somatique

Lors du développement somatique de l'animal, 131 des 1090 cellules générées subissent la mort cellulaire de manière reproductible : ce sont toujours les mêmes cellules définies par leur place dans le lignage qui meurent, et chacune à un moment précis du développement. *C. elegans* se différencie radicalement des mammifères puisque le nématode adulte comporte un nombre fixe de cellules somatiques. L'apoptose intervient donc dans la définition de ce nombre constant, en éliminant précisément 131 cellules lors du développement. L'apoptose lors du développement aurait un rôle dans la définition et la séparation des lignées cellulaires qui produiront les cellules somatiques adultes. 105 des 131 cellules qui subissent l'apoptose sont des neurones. De ce point de vue, le développement neuronal des nématodes ressemble à celui des vertébrés, caractérisé par une surproduction de cellules, suivie de la mort de certaines d'entre elles, vraisemblablement pour faire correspondre le nombre de neurones qui innervent un tissu cible avec la taille de celui-ci. Des analyses génétiques et biochimiques de ces morts cellulaires ont conduit à l'identification d'une voie apoptotique, conservée au cours de l'évolution, qui régule toutes les apoptoses chez *C. elegans* (Ellis *et al.*, 1991). Nous aborderons les composants de cette voie plus loin. L'apoptose lors du développement est médiée par la même machinerie centrale d'exécution que l'apoptose dans la lignée germinale. Néanmoins, l'activation de cette machinerie est régulée différemment dans le soma et la lignée germinale (voir point 2.2.).

2.1.2. Apoptose dans la lignée germinale

Les gonades des individus hermaphrodites consistent en deux bras en forme de U, qui se rejoignent en un utérus commun (Fig. 6). Contrairement aux tissus somatiques, la lignée germinale prolifère continuellement pendant le développement larvaire et chez les vers adultes. Chez l'adulte hermaphrodite, les cellules germinales progressent spatialement dans la gonade, et temporellement à travers plusieurs étapes de différenciation. La cellule la plus distale dans chaque « bras » (DTC : distal tip cell) exprime un facteur de croissance qui induit la prolifération mitotique des cellules germinales adjacentes. Celles-ci jouent le rôle de population de cellules souches. Dans la partie distale de chaque bras de la gonade, les noyaux des cellules germinales ne sont pas complètement entourés d'une membrane, et se trouvent donc dans un large syncytium. Cependant, chaque noyau agit indépendamment de ses voisins, ce qui nous permet de parler de « cellules » germinales. Lors de leur passage dans la « zone de transition », l'influence de la DTC diminue et elles arrêtent de se diviser pour initier la méiose. À la fin de l'étape pachytène de la prophase I (suite à l'activation de la voie

Ras/MAPK), au niveau du coude de la gonade, elles complètent la prophase, subissent les étapes finales de maturation et finissent la méiose après la fécondation, laquelle a lieu lorsque l'oocyte traverse la spermathèque (Schedl, 1997). En conditions normales, environ la moitié des cellules germinales femelles ne complètent pas la méiose, mais meurent par apoptose au niveau du coude de la gonade (Gumienny *et al.*, 1999). L'hypothèse la plus probable pour expliquer le rôle physiologique de la mort massive d'oocytes potentiels est que l'apoptose élimine des cellules germinales générées en excès pour synthétiser les composants cytoplasmiques nécessaires à la maturation des oocytes. En effet, chez *C. elegans*, ce sont les cellules germinales en méiose précoce qui joueraient le rôle de cellules nourricières, et qui présentent donc un taux de transcription relativement élevé. Les transcrits générés par ces cellules sont exportés vers le centre cytoplasmique commun et ensuite incorporés dans les oocytes matures. Les noyaux en excès sont éliminés par un mécanisme de sélection stochastique telle que le nombre de précurseurs d'oocytes autorisés à survivre est en relation avec la quantité de cytoplasme disponible. On ne peut exclure qu'un contrôle de qualité puisse également s'effectuer à ce stade, comme cela a été proposé par le mécanisme « MSUD » (*meiotic silencing by unpaired DNA*) sur base des travaux réalisés sur *Neurospora* (Shiu *et al.*, 2001), même si une inhibition de l'apoptose ne semble pas résulter chez *C. elegans* en une proportion plus grande d'oocytes malformés ou de létalité embryonnaire (Gumienny *et al.*, 1999). Les mécanismes qui régulent l'apoptose des cellules germinales sont encore méconnus. Après avoir décrit la voie centrale d'exécution de l'apoptose, nous ferons le point sur les voies de régulation.

2.2. Voie centrale d'exécution

Des cribles génétiques ont conduit à l'isolement de mutations qui ont permis d'identifier quatorze gènes communs à tous les processus d'apoptose. Des analyses phénotypiques à partir de doubles mutants ont permis de placer ces gènes dans une voie génétique, constituée de quatre étapes distinctes : la « décision » par des cellules individuelles de vivre ou de mourir, l'exécution de la mort cellulaire si la décision de mourir a été prise, la phagocytose de la cellule mourante par une des cellules voisines, et enfin, la dégradation de la cellule morte au sein de la cellule phagocytaire. Onze des quatorze gènes sont requis pour les trois dernières étapes et sont dès lors intégrés dans un modèle de voie centrale commune, décrite brièvement ci-dessous (Schedl, 1997) et représentée en Fig. 7.

2.2.1. Les acteurs centraux

Deux gènes, *ced-3* et *ced-4* (*ced* = *cell death abnormal*), sont requis pour le processus menant à la mort de la cellule (Ellis & Horvitz, 1986). Le produit du premier est un membre de la famille des caspases (*cysteiny aspartate-specific proteases*) ; le produit du second est homologue à Apaf-1, retrouvé chez les mammifères ; il fonctionne génétiquement comme régulateur positif de CED-3 (Vaux, 1997).

Un troisième gène, *ced-9*, protège de l'apoptose les cellules destinées à survivre. La protéine CED-9 est homologue à l'oncoprotéine Bcl-2 (Hengartner & Horvitz, 1992), qui favorise la survie des cellules chez les mammifères.

2.2.2. L'exécution

Des études biochimiques ont suggéré que l'événement clef requis pour la mort apoptotique des cellules chez *C. elegans* est le passage de la forme inactive de CED-3 (pro-caspase) à celle de caspase active. L'activation de CED-3 requiert l'association de la forme zymogène à CED-4 et une oligomérisation de ce complexe. Ce dernier constitue probablement

l'équivalent de l'apoptosome des mammifères, qui consiste en au moins trois protéines – la caspase-9, Apaf-1, et le cytochrome *c*. Notons cependant que l'intervention du cytochrome *c* dans l'« apoptosome » de *C. elegans* est controversée. Contrairement à Apaf-1, CED-4 ne possède pas de domaine de liaison au cytochrome *c* et n'est pas localisée à la mitochondrie (Danial & Korsmeyer, 2004). En effet, le déplacement de l'interaction avec CED-9 induit la translocation de CED-4 en région périnucléaire (Chen *et al.*, 2000). Ainsi libérée, CED-4 oligomérisse et la protéine CED-3 (qui est liée à CED-4) s'active de manière auto-catalytique par un mécanisme de proximité (Yang *et al.*, 1998). Dans les cellules destinées à survivre, la formation de cet « apoptosome » est empêchée, au moins en partie, par le fait que CED-4 est liée à et séquestrée par CED-9, formant un complexe stable en surface de la mitochondrie (Conradt & Horvitz, 1998).

Dans la voie d'exécution, les modifications sont post-traductionnelles, tandis que la voie de régulation compte aussi des modifications transcriptionnelles. Les interactions protéine-protéine sont indispensables à la voie d'exécution, et en particulier celles qui mettent en jeu CED-9, considérée comme point d'intégration des signaux pro- et anti-apoptotiques (voir point 2.3), et premier élément de la cascade d'exécution aboutissant à l'activation des caspases.

Celles-ci existent à l'état latent dans le cytoplasme sous forme de précurseurs inactifs, composés d'un pro-domaine (court pour les caspases effectrices, long pour les caspases initiatrices), d'un domaine de 20 kDa et d'un domaine de 10 kDa. Suite à une activation par une caspase d'initiation (comme CED-3, activée par le mécanisme décrit ci-dessus), les domaines de 20 kDa et de 10 kDa de la pro-caspase exécutive s'associent et le complexe dimérise pour former la caspase exécutive active. Les substrats des caspases ont en commun un motif de quatre acides aminés (DEVD), et le clivage a lieu entre la valine et l'acide aspartique. Les substrats sont nombreux et leur clivage assure l'activation ou l'inhibition de protéines, conduisant ainsi, directement ou indirectement, aux divers aspects morphologiques caractéristiques d'une cellule en apoptose.

2.3. L'apoptose germinale et l'apoptose somatique se distinguent par l'intégration des signaux

Il semblerait que les voies d'exécution de l'apoptose soient identiques pour les deux types d'apoptose décrits ci-dessus (l'apoptose dans la lignée germinale et l'apoptose lors du développement somatique), mais que les voies d'intégration des signaux diffèrent.

2.3.1. Trois voies génétiques distinctes (au moins) conduisent à l'apoptose dans la lignée germinale

Nous distinguerons trois situations dans lesquelles l'apoptose de cellules germinales est induite : l'apoptose physiologique, l'apoptose induite par une infection bactérienne, et celle induite par un stress génotoxique.

L'apoptose physiologique des cellules germinales, c'est-à-dire s'intégrant dans leur processus normal de maturation, semble indépendante d'un stimulus extérieur. L'activation de la voie Ras/MAPK est nécessaire mais non suffisante à l'apoptose physiologique des cellules germinales, directement ou indirectement. La voie Ras/MAPK pourrait réguler directement la machinerie apoptotique *via* la phosphorylation d'une protéine de la voie d'exécution, comme CED-9. Alternativement, la voie Ras/MAPK pourrait induire indirectement l'apoptose des cellules germinales, par exemple en favorisant la progression des cellules du stade pachytène, alors résistantes aux signaux pro-apoptotiques, vers un stade de différenciation sensible à ces signaux (Gumienny *et al.*, 1999).

Une infection par des bactéries pathogènes peut induire l'apoptose des cellules germinales chez *C. elegans* (Aballay *et al.*, 2001). La colonisation de l'intestin de *C. elegans* par *Salmonella typhimurium* provoque une augmentation du taux de mort cellulaire dans les gonades, par une voie *ced-3* et *ced-4* dépendante, ce qui suggère qu'il s'agit bien d'un mécanisme apoptotique. Des vers mutés pour *ced-3* ou *ced-4* sont hypersensibles à la mort induite par *S. typhimurium*, indiquant l'implication de CED-3 et CED-4 (et de l'apoptose) dans la réponse de défense de *C. elegans* face à *S. typhimurium*. Le mécanisme par lequel l'apoptose des cellules germinales protège l'hôte des effets délétères de l'attaque par un pathogène n'est pas clair.

Enfin, les stress génotoxiques induisent l'apoptose des cellules germinales en méiose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules germinales en mitose. Lors d'un dommage à l'ADN, les cellules germinales sont en effet capables de fournir deux réponses précises, à savoir l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ces réponses sont séparées spatialement (Stergiou & Hengartner, 2004), la première ayant lieu dans la partie distale de la gonade, où les cellules prolifèrent par mitose, tandis que la seconde a lieu dans la partie de la gonade où les cellules sont en prophase de la méiose. Les cellules somatiques, par contre, n'ont pas ou peu de points de contrôle durant le développement embryonnaire. Les dommages à l'ADN, par exemple suite à une irradiation γ , induisent l'apoptose des cellules germinales par une voie dépendante de l'homologue du p53 des mammifères, *cep-1* (Schumacher *et al.*, 2001), et du point de contrôle *hus-1* (Hofmann *et al.*, 2002). Il y a alors activation transcriptionnelle du gène codant CED-13 (Schumacher *et al.*, 2005), protéine à un domaine BH3, qui peut activer la voie d'exécution en se liant à CED-9 (Fig.8). EGL-1, protéine à un domaine BH3 homologue à la protéine Bad des mammifères (Conradt & Horvitz, 1998), est aussi capable de se lier à CED-9 et de déclencher l'apoptose des cellules germinales, suite à un dommage à l'ADN, par un mécanisme que nous évoquerons plus loin. Il semblerait qu'EGL-1 ne soit pas requis pour l'apoptose physiologique des cellules germinales.

2.3.2. Régulation de l'apoptose somatique lors du développement

Deux origines possibles de l'apoptose lors du développement « somatique » peuvent être avancées chez *C. elegans* (Metzstein *et al.*, 1998). Premièrement, elle pourrait être activée par un défaut dans un mécanisme fondamental pour la cellule. Deuxièmement, l'apoptose peut être vue comme l'aboutissement d'un processus normal. Ainsi, elle pourrait être un état différencié exprimé comme conséquence d'un processus normal de sélection parmi une série d'autres choix de différenciation. Subir l'apoptose est alors similaire à l'adoption de n'importe quel autre état différencié, telle la différenciation en un neurone ou une cellule musculaire. Il semblerait du reste que des gènes (*ces-1* et *ces-2* : cell death specification) soient responsables de la spécificité de l'apoptose pour différentes lignées cellulaires (Ellis & Horvitz, 1991). Pour appuyer cette idée, rappelons que *C. elegans* se différencie radicalement des mammifères par le fait que le nombre de cellules somatiques de l'individu adulte est constant et que ce nombre fixe est obtenu après apoptose de 131 cellules.

EGL-1 est requise pour la plupart, si pas toutes les apoptoses somatiques (Conradt & Horvitz, 1998). Comme évoqué ci-dessus, EGL-1 interviendrait aussi pour l'apoptose de cellules germinales suite à un stress (dommage à l'ADN, infection bactérienne). Le domaine BH3 est responsable de l'association d'EGL-1 avec CED-9, qui favorise la libération de CED-4, aboutissant à l'action protéolytique et létale de CED-3 comme décrit plus haut (Woo *et al.*, 2003 ; Yan *et al.*, 2004) (Fig. 9). Un schéma résumant les voies de régulation et d'exécution de l'apoptose chez *C. elegans* se trouve en Fig. 10.

2.4. Une « highway moléculaire » relie les modules apoptotique et mitotique.

2.4.1. Identification d'un lien entre deux modules

Récemment au laboratoire, un crible double-hybride en levure a été réalisé à partir, notamment, des données de l'interactome du ver (comme évoqué en Fig.5 ; Milstein & Vidalain, communication personnelle). Les acteurs connus pour leur implication dans l'apoptose présents dans la carte de l'interactome mais également les protéines qui ont un rôle présumé dans l'apoptose (« récoltées » par des données génétiques, l'observation de motifs conservés, etc...) ont été utilisés comme appât et testés contre une librairie d'ADN complémentaire en proie ainsi que contre l'ORFéome de *C. elegans* (Reboul *et al.*, 2003).

Ce crible a permis d'identifier les interactions entre protéines déjà connues pour leur participation au processus de l'apoptose, mais de nouveaux interacteurs ont également été mis en évidence. La carte ainsi générée comporte un trop grand nombre d'interactions pour être facilement manipulée et étudiée. Dans l'expérience pilote que nous allons décrire, le choix a donc été fait de caractériser plus en profondeur les interacteurs de CED-9 (point d'intégration des signaux et point de « non-retour » de la voie d'exécution) ainsi que la voie d'exécution de l'apoptose (Fig. 11). Les interactions en jeu ont été confirmées par co-purification d'affinité (GST-pulldown). La protéine codée par la séquence F25F8.1 qui n'est associée à aucun gène connu et SPD-5 ont été « pêchées » parmi les nouveaux candidats interacteurs de CED-9. Contrairement à ce qu'on observe avec F25F8.1, un knock-down de *spd-5* semble affecter l'apoptose (Fig. 12a). De plus, SPD-5 est particulièrement intéressante en ce sens que son interaction physique avec CED-9 (confirmée par co-purification d'affinité et validée par hybridation *in situ* des ARN messagers dans le ver – Fig. 12b) pourrait constituer ce que nous avons qualifié plus haut de « highway moléculaire », connectant deux machineries moléculaires essentielles pour la cellule, l'apoptose et la mitose.

2.4.2. SPD-5 est requise pour l'assemblage et la maturation du fuseau mitotique chez *C. elegans*

Dans les cellules animales en division, le fuseau mitotique bipolaire est organisé par deux centrosomes, un à chaque pôle. Ces « centres organisateurs de microtubules » permettent l'assemblage polarisé des microtubules (MTs), qui capturent et ségrègent les chromosomes lors de la mitose. Les centrosomes organisent également les MTs pendant l'interphase, dans les cils et flagelles, et peuvent influencer la polarité de la cellule. De structure à peu près sphérique, ils sont très dynamiques et composés de nombreuses protéines. Chaque centrosome est constitué d'une paire de courts cylindres orthogonaux composés de microtubules, appelés centrioles, enfouis dans un matériel dense aux électrons, le MPC (matériel péricentriolaire) ou centromatrice.

Chez *C. elegans* et pour la plupart des espèces animales, les centrioles sont éliminés lors de l'oogenèse. À la fécondation, le gamète mâle fournit une seule paire de centrioles, mais peu ou pas de centromatrice associée. Ce centrosome va ensuite se dupliquer, croître et mûrir en une paire de centrosomes fonctionnelle. Ces étapes nécessitent la contribution d'une centromatrice maternelle. Les gènes codant les constituants de cette centromatrice sont encore peu connus, même si certaines protéines responsables de l'assemblage du fuseau mitotique ont été identifiées. Hamill *et al.* (2002) ont isolé un gène à expression maternelle, *spd-5* (*spindle-defective*), qui code une protéine centrosomale nécessaire à la localisation d'autres protéines au centrosome, et à l'assemblage du fuseau mitotique (Fig. 13).

Suite à des expériences génétiques et de localisation de différentes protéines impliquées dans le processus conduisant à la formation du fuseau mitotique, les conclusions suivantes ont été tirées.

SPD-5 est localisée au centrosome lors de la première division du zygote de *C. elegans*, et semble requise pour l'accumulation de protéines centrosomales. Parmi celles-ci, AIR-1, une Aurora A-like kinase requise pour l'accumulation de la γ -tubuline aux centrosomes, et ZYG-9, protéine stabilisant les microtubules aux centrosomes. Cependant, SPD-5 serait dispensable à partir du stade 24 cellules du développement embryonnaire. *spd-5* semble donc avoir un rôle dans le début de l'embryogenèse, mais est aussi exprimé dans les cellules de la lignée germinale.

SPD-5 interagit génétiquement avec la dynéine, protéine motrice, située à l'extrémité dite négative des microtubules, et jouant également un rôle dans le fonctionnement du fuseau.

SPD-5 est essentielle pour la formation de l'aster autour du pronucleus mâle. Or, chez *C. elegans*, la position du pronucleus mâle spécifie le pôle postérieur du zygote et détermine l'axe antéro-postérieur. Le non-assemblage de l'aster autour du pronucleus mâle résulte en une perte de la polarité cellulaire. Ceci suggère que SPD-5, via la formation de l'aster, serait responsable de la définition de cet axe antéro-postérieur. Ceci est consistant avec l'absence d'aster et de polarité observée chez des mutants de *spd-5*.

L'accumulation de SPD-5 aux centrosomes dépend quant à elle de SPD-2.

2.4.3. Approches pour l'établissement du rôle de « highway » entre modules apoptotique et mitotique

On peut en toute hypothèse attribuer un sens biologique à ce lien entre les machineries de l'apoptose et de la mitose (Fig. 14), ou plus particulièrement entre l'acteur (plus que probablement) central de l'apoptose (CED-9) et la protéine en amont de l'organisation du fuseau mitotique (SPD-5). Il nous paraît étonnant que ce soit par hasard si la cellule dispose d'un lien physique entre deux modules fonctionnels à buts opposés, l'un étant responsable de la mort de la cellule, l'autre impliqué dans sa division. Le fait que SPD-5 inhibe l'apoptose des cellules germinales pourrait être dû au fait que, lors de la mitose, la cellule n'a pas « intérêt » à rentrer en apoptose.

CED-9 semble en effet avoir un rôle central à jouer dans les processus menant à l'apoptose. Cette protéine constitue non seulement un point d'intégration de nombreux signaux (en amont), intervenant ainsi dans la « prise de décision » par la cellule d'« apoptoser » ou non, mais CED-9 est également le point de départ de la voie d'exécution (en aval) qui va conduire *in fine* à la mort cellulaire.

Dès lors, une clef de la compréhension du fonctionnement de la machinerie moléculaire apoptotique et du lien fonctionnel qui pourrait exister entre celle-ci et la formation du fuseau mitotique consiste à disséquer les différentes interactions protéine-protéine existant avec CED-9. Analyser l'interaction entre CED-9 et SPD-5 serait une première étape susceptible de contribuer à la compréhension de la manière dont cette « highway moléculaire » fonctionne et comment elle interviendrait - en toute hypothèse - dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. Deux stratégies sont envisagées ici pour caractériser finement, non seulement le rôle de « highway » joué par l'interaction CED-9-SPD-5, mais également les interactions existant entre CED-9 et deux autres de ses partenaires, CED-4 et F25F8.1.

3. Approche « CED-9-centrée »¹

Comme évoqué ci-dessus, CED-9 occupe non seulement une position centrale dans les interactions qui sous-tendent le sous-réseau apoptotique, mais participerait également, par son lien physique avec SPD-5, à l'établissement d'une « highway moléculaire » dans la lignée germinale et lors des premières étapes du développement embryonnaire de *C. elegans*.

Une première approche visant à la dissection des interactions liant CED-9 à ses partenaires protéiques est abordée ici. CED-9 sera pris comme « point de départ » des investigations. L'approche « CED-9-centrée » visera à obtenir des informations qui relèvent du niveau des domaines d'interactions, en tentant de déterminer, sur la structure tridimensionnelle dont on dispose pour CED-9, les sites intervenant dans le lien physique avec chacun des partenaires protéiques SPD-5, CED-4 et F25F8.1 (Fig. 15).

3.1. Perturbation du réseau

Pour analyser le fonctionnement d'un réseau ou d'un sous-réseau (module fonctionnel), une possibilité est de le perturber, et d'observer ensuite le phénotype éventuel. Jusqu'ici, ce genre d'approche visait à détruire les nœuds d'un réseau donné, par exemple en silençant un gène par knock-out ou par RNAi. Elle a aussi été pratiquée pour effectuer des doubles perturbations susceptibles de révéler les relations d'épistasie entre les gènes impliqués (Tewari *et al.*, 2004). Or, l'absence d'une protéine (ou nœud) affecte nécessairement tous les liens qu'elle exerce avec des partenaires et donc potentiellement des fonctions diverses auxquelles ces protéines participent. En d'autres termes, on ne peut expliquer aisément à quoi le phénotype observé est lié et s'il s'agit d'une conséquence de la perte du nœud ou des liens. Alternativement, on peut concevoir des perturbations pour lesquelles seule la capacité d'interaction (ou lien) entre deux nœuds serait affectée. Le phénotype observé sera alors spécifiquement, mais pas nécessairement de manière directe, associé à la perte d'une interaction. Les cas de figures résultant de ces deux types de modifications de l'état d'un réseau sont différents, et représentés en Fig. 16. Cibler un lien donné semble de ce point de vue particulièrement intéressant, d'autant plus si le lien perturbé constitue une « highway » moléculaire, puisque le phénotype observé sera dû au découplage de deux machines moléculaires.

3.2. Sélection d'allèles « edgétiques »

L'identification de mutations qui affectent une relation fonctionnelle entre les éléments d'un sous-réseau peut être réalisée à l'aide de cribles basés sur une sélection d'allèles en fonction de leur phénotype en double-hybride. Il s'agit en effet d'affecter un lien d'interaction physique au départ d'un nœud, et de conserver éventuellement tous les autres liens. Il est par exemple possible d'identifier par reverse double-hybride (Fig. 17a ; Vidal, 1996) des allèles défectifs pour une interaction (ou IDAs pour « *interaction defective alleles* »). Brièvement, pour une interaction, l'ORF d'un des deux interacteurs est abondamment mutagénisée de manière aléatoire (par PCR). La collection d'allèles obtenue est ensuite clonée dans un vecteur approprié pour l'expression en levure et pour un test d'interaction par double-hybride. Les allèles défectifs pour l'interaction sont sélectionnés sur un milieu permettant la contre-

¹ Nous qualifierons également de « link-based » le point de vue adopté par cette première approche « CED-9-centrée », puisqu'il s'agit comme nous le verrons d'une stratégie basée sur la perturbation spécifique de liens au départ de CED-9.

sélection de l'interaction. Ce principe a été appliqué pour trois des quatre interacteurs de CED-9, à savoir CED-4, F25F8.1 ET SPD-5 (Dreze, Milstein, Vidalain, communication personnelle). L'ORF codant CED-9² a été mutagénisée et des IDAs ont été sélectionnés sur milieu approprié. Ces allèles sont notés CED-9 (ida^{F25F8.1-}), CED-9 (ida^{CED-4-}) et CED-9 (ida^{SPD-5-}). En retestant les allèles de CED-9 défectifs pour l'interaction avec un partenaire donné contre les autres proies, il est possible de réduire le nombre d'allèles en sélectionnant ceux qui sont défectifs pour une seule interaction et conservent leur interaction avec tous les autres (Fig. 17b). Les mutations ont été localisées sur la structure tridimensionnelle de CED-9 (Fig. 18), ce qui a conduit à deux observations importantes.

Premièrement, les résidus touchés par les mutations sont principalement localisés en surface de la protéine, tandis que des mutations qui donnent lieu à une perte de la fonction de « nœud », et pas uniquement d'un « lien », sont localisées au cœur de CED-9. Ceci est consistant avec le fait que les acides aminés situés au centre des structures protéiques font souvent partie du cœur hydrophobe, lequel intervient dans la stabilité de la protéine. En touchant à des résidus précis en surface, il est donc possible de n'affecter qu'une interaction, sans déstabiliser le « nœud ».

Deuxièmement, on constate que les acides aminés mutés sur les différents IDAs de CED-9 ne se recouvrent pas. Autrement dit, les résidus qui affectent un lien sont spécifiques de celui-ci. L'identification d'allèles de CED-9 défectifs pour leur interaction avec EGL-1 n'a pu être réalisée en suivant la même stratégie de reverse double-hybride que celle évoquée ci-dessus, vu la faiblesse de l'interaction CED-9-EGL-1 en double-hybride. Un autre système a donc été mis au point au laboratoire pour tenter d'identifier de tels IDAs. Il est possible d'identifier des mutants de CED-9 qui peuvent toujours interagir avec CED-4, et ce malgré la présence de EGL-1 qui induit normalement la rupture de l'interaction CED-9-CED-4. Ces allèles sont notés CED-9 (ida^{EGL-1- CED-4+}) et ont été identifiés par un système d'expression de trois éléments en levure mis au point au laboratoire. La librairie d'allèles mutés de CED-9 générée par PCR est clonée dans un vecteur qui permet l'expression en levure et la fusion à DB en vue d'un test d'interaction par reverse double-hybride. Ces fusions sont exprimées en levures contenant AD-CED-4 et EGL-1 (introduit en levure dans un vecteur permettant un niveau d'expression semblable à ceux de AD-CED-4 et DB-CED-9, et sa localisation dans le noyau). Un milieu sélectif permet de sélectionner les triples transformants. Ceux-ci sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de croître en absence d'uracile, indiquant que DB-CED-9 est toujours capable d'interagir avec AD-CED-4, malgré la présence de EGL-1. En effet, ce n'est que si cette interaction reconstitue Gal4p que l'activation de la transcription du gène rapporteur *URA3* peut s'observer (Fig. 19). Les ORFs codant les allèles de CED-9 sélectionnés sont amplifiés directement à partir d'un lysat des levures et les produits sont séquencés pour déterminer les mutations potentielles.

Les acides aminés mutés sont alors localisés sur la structure cristalline de CED-9. La plupart des mutations qui affectent la liaison de EGL-1 à DB-CED-9 sont localisées au niveau du sillon hydrophobe qui constitue le site de liaison d'EGL-1 à CED-9. Un des CED-9 (ida^{EGL-1- CED-4+}) identifiés porte la mutation G169E, caractérisée plus tôt (Hengartner & Horvitz, 1994). Cette mutation est responsable de l'allèle gain de fonction (*gf*, « gain of function ») de CED-9, ce qui constitue une preuve de principe pour le système utilisé. Cette approche, basée sur la technique de reverse double-hybride en levure (R-Y2H) (Vidal *et al.*, 1996) a donc permis simultanément de sélectionner l'interaction de CED-9 avec CED-4 et de contre-sélectionner la liaison d'EGL-1 à CED-9.

² Il s'agit en réalité de CED-9ΔTM, c'est-à-dire CED-9 sans son domaine transmembranaire. On observe en effet que la protéine entière ne permet la détection d'aucun interacteur en double-hybride. Ceci est probablement dû à la forte hydrophobicité du domaine transmembranaire qui pourrait être à l'origine d'un dépliement de la protéine.

Les IDAs sont également qualifiés d'« allèles edgétiques » (genetic of edges), dans la mesure où le « nœud » (la protéine) est toujours présent, mais où un lien (« edge ») a disparu.

La génération d'allèles de ce type pour une protéine donnée présente divers avantages. D'une part, cette approche peut être utilisée pour analyser la liaison compétitive de deux protéines à un même partenaire (comme ici l'exclusivité des interactions CED-9-EGL-1 et CED-9-CED-4), permettant ainsi une meilleure compréhension de la dynamique des interactions en jeu. D'autre part, en enlevant un lien dans un réseau ou module d'interactions particulier, *in vivo*, il sera possible d'observer le phénotype directement lié à la perte de ce lien, et non à une perturbation globale d'un sous-réseau suite à la perte d'un nœud. Enfin, la localisation sur une structure tridimensionnelle de la mutation qui affecte une interaction donnée peut fournir des informations sur la manière dont la protéine et ses partenaires s'agencent pour donner lieu à une fonction. La Fig. 20 reprend les liens génétiques et physiques, ainsi que les liens « edgétiques » établis à partir de CED-9.

4. Approche « interacteurs-centrée »

L'approche explicitée ci-dessus permet l'analyse des « liens » entre protéines, plus particulièrement en déterminant sur CED-9 les sites jouant potentiellement un rôle dans les interactions avec des partenaires protéiques. Une deuxième approche pour l'analyse des interactions au sein du module apoptotique, et de la « highway » supposée exister avec la mitose, est qualifiée d'« interacteurs-centrée ». Ce sont en effet des interacteurs de CED-9, à savoir SPD-5, CED-4 et F25F8.1, qui sont cette fois pris comme « point de départ » à la dissection des liens. Il ne s'agit plus ici de toucher aux liens entre protéines concernées (point de vue « link-based » de l'approche « CED-9 centrée »), mais directement de disséquer ces protéines afin de « cartographier » les domaines qui sous-tendent les interactions en jeu (Fig. 21). Nous pouvons donc qualifier de « domain-based » le point de vue adopté dans le cadre de cette seconde approche, puisque il s'agit de déterminer les domaines d'interactions des différents partenaires de CED-9 avec celle-ci.

4.1.1. Les domaines comme unités fonctionnelles de base

Les domaines protéiques interviennent dans les interactions entre protéines, ou entre protéines et d'autres partenaires (substrat, ADN, ARN), assurant ainsi des fonctions biologiques aussi diverses que des activités enzymatiques ou de transactivation. De plus, les domaines ont un rôle probable tant adaptatif qu'évolutif. En effet, un petit nombre de domaines peut conférer diverses fonctions à la molécule multi-domaine formée. Par ailleurs, on peut imaginer que les domaines constituent aussi une unité fonctionnelle d'évolution, et que par combinatoire, la complexité - tant fonctionnelle que structurale - apparaisse progressivement. On peut parler de modularité, les domaines étant en quelque sorte les blocs de construction qui ont servi à la formation des protéines. Ceci serait favorable aux essais-erreurs au cours de l'évolution pour donner lieu à de nouvelles fonctions, à partir d'un « kit de construction ». Rappelons que Gilbert et Crick (Crick, 1979 ; Gilbert, 1981) ont proposé une hypothèse, l'« exon shuffling », selon laquelle les nombreux exons qui semblent coder des entités structurales seraient à mettre en rapport avec les domaines en tant qu'unité d'évolution et de combinaison.

Il convient de noter que les domaines au sein des protéines peuvent être rapprochés du concept de module au sein d'un réseau, tel qu'évoqué plus haut, puisqu'on considère ici des entités « détachables » (du moins conceptuellement, nous y reviendrons), conservant une certaine fonctionnalité, et dont les inter-connections conditionnent la complexité du système (de la protéine, du réseau). En somme, le système de « modules » d'un interactome d'une cellule ou d'un organisme repose lui-même sur un système de « modules » appartenant cette fois aux protéines constituant les « nœuds » de la carte interactomique.

4.1.2. Domaines conformationnels, domaines séquentiels

Deux types de domaines intra-protéiques sont à considérer. Ceux dont les résidus se suivent sur la séquence (structure primaire), c'est-à-dire dont l'existence peut être attribuée à cette seule portion de séquence, sont qualifiés pour cette raison de séquentiels (comme on peut parler d'épitopes séquentiels, ou encore linéaires). Dans ces conditions, on peut imaginer que les domaines de la protéine soient séparables, c'est-à-dire que la protéine est constituée d'un assemblage de blocs de construction disposés « à la suite » l'un de l'autre. C'est l'idée de modularité : on peut enlever ou ajouter un domaine en sectionnant la protéine entre ces domaines.

Un domaine « conformationnel », en revanche, est formé par le rapprochement, suite à la prise d'une conformation de la protéine dans l'espace (structure tertiaire), de certains résidus éloignés dans la séquence (Fig. 22). Dans ce cas, le domaine n'est pas « réductible » à sa séquence, puisqu'il dépend d'une structure tridimensionnelle. Éventuellement, un tel domaine peut être « partagé » entre plusieurs sous-unités peptidiques.

Sur le plan évolutif, il est envisageable qu'une fois une séquence sélectionnée suite à la pression de sélection, celle-ci puisse ensuite s'exercer sur la structure tridimensionnelle. Dans ce cas, on peut perdre au fur et à mesure la séquentialité des résidus impliqués. Un domaine conformationnel (une caractéristique tridimensionnelle) émergerait ainsi progressivement. Les protéines ne sont plus « séquentiellement fragmentables » en blocs de construction puisqu'ils se retrouvent « enchevêtrés » les uns dans les autres. Cette hypothèse n'exclut pas qu'une protéine comporte des domaines « détachables » - séquentiels - et également des domaines de type « conformationnel » que l'on ne peut « extraire » de la séquence.

Une tentative de discrimination de ces deux types de domaines sera envisagée au cours de ce travail.

4.1.3. Intérêt des domaines pour l'étude des interactions protéine-protéine

Les deux point de vue (« link-based » et « domain-based ») ont donc pour but d'affiner la connaissance de l'interaction entre deux partenaires protéiques, en s'intéressant à leur contenu en domaines. Nous pensons en effet que l'analyse des interactions entre protéines peut être améliorée si on se place au niveau des domaines, plutôt que de la protéine entière. Comme illustré en Fig. 23, des hypothèses peuvent être émises à partir de données concernant les domaines d'interaction, alors qu'elle n'auraient pu être envisagées si on ne dispose que des nœuds et des liens physiques entre eux. De manière générale, il s'agira, concernant une portion plus ou moins étendue de l'espace protéique, de déterminer ces domaines protéiques et leurs connexions. Une carte des interactions reposant sur les domaines intra-protéiques responsables d'interactions inter-protéiques pourra être établie. Autrement dit, il s'agirait d'une carte de « domain-domain interactome ». Celle-ci sera susceptible de constituer un nouveau point de départ à l'étude fonctionnelle du ou des « modules » qu'elle contient.

Les travaux réalisés par Otilie *et al.* (1997) rendent compte de l'idée qui a inspiré la stratégie de recherche de domaines d'interaction au sein du module apoptotique de *C. elegans* envisagée au cours de ce travail. Nous exposerons plus loin les résultats de cette expérience clef qui a permis la mise en évidence du domaine d'interaction de CED-4 avec CED-9, en comparaison avec l'approche que nous envisageons ici. De plus, la méthode systématique que nous allons évoquer ci-dessous a déjà fait ses preuves pour la détermination de domaines d'interaction de la protéine TIR-1 (Milstein & Vidalain, communication personnelle).

Après avoir exposé le concept sous-jacent à cette technique systématique et exposé les résultats ainsi obtenus, nous discuterons ceux-ci et nous reviendrons sur ces travaux que nous considérons comme termes de référence pour notre approche.

5. Objectif de notre travail

Pour la compréhension du fonctionnement du sous-réseau constitué par les interacteurs de CED-9 au sein du module apoptotique chez *C. elegans* et pour aborder la fonction supposée de « highway » partagée entre les modules distincts « apoptose » et « mitose », nous allons utiliser une approche complémentaire à celle reposant sur la sélection d'allèles « edgétiques ». Celle-ci a permis la destruction spécifique de liens entre CED-9 et certains de ses interacteurs, ainsi qu'une localisation sur CED-9 des sites intervenant potentiellement dans ces interactions. En parallèle avec cette stratégie que nous avons qualifiée de « CED-9-centrée », nous nous proposons de compléter les informations concernant les liens qui sous-tendent le module dans le cadre de la problématique « interacteurs-centrée » mentionnée plus haut. Il s'agira en effet de déterminer, pour trois partenaires de CED-9, à savoir CED-4, F25F8.1 et SPD-5, le domaine nécessaire et suffisant pour l'interaction avec CED-9. Le point de vue adopté sera donc qualifié de « domain-based » puisque reposant sur la considération des domaines d'interactions comme « nœuds » du sous-réseau étudié.

Nous aurons, avec ce genre de données en main, des informations « dans les deux sens », puisque nous disposerons d'informations détaillées sur la manière dont CED-9 interagit avec ces trois protéines, grâce à l'approche « CED-9-centrée » ou « link-based » et inversement, grâce à l'approche « interacteurs-centrée », sur la manière dont ses trois interacteurs se lient à CED-9.

Pour identifier le « domaine minimal d'interaction » (ou DMI) avec CED-9 de chacun des trois interacteurs cités plus haut, nous allons utiliser une approche systématique. Il s'agira de fragmenter, de manière régulière et progressive, les protéines d'intérêts, de façon à disposer d'une collection de peptides de longueurs variables qui seront testés pour leur capacité d'interaction avec CED-9. La méthodologie appliquée implique des fragmentations systématiques des ORFs codant CED-4, F25F8.1 et SPD-5. À l'aide d'une technologie de clonage par recombinaison (GATEWAY™), il sera possible de générer une ressource de fragments - ou encore « fragmentome » - pour chaque interacteur, assurant la disponibilité de ces fragments pour leur caractérisation fonctionnelle en levure. Chaque fragmentome sera organisé sous forme de matrice, de sorte que la disposition de chaque fragment dans celle-ci soit uniquement fonction de sa longueur et de sa situation sur la séquence protéique complète. Ce schéma de disposition étant maintenu pour les tests d'interaction, il sera possible, pour chaque interacteur, de déterminer quel peptide correspond au DMI, puisqu'il s'agira du plus court fragment protéique interagissant avec CED-9 dans un contexte double-hybride.

1. Analyse de domaines par fragmentations systématiques

1.1. Description générale du concept

La complexité inscrite dans un sous-réseau ou module repose sur la dynamique spatiale ou temporelle qui anime les interactions en jeu, résultant en une diversité des « outputs » du réseau. Puisqu'un nœud est susceptible d'être lié à plusieurs partenaires, à des moments et localisations variables, on s'attend à ce que chaque interaction physique implique entre les acteurs une reconnaissance spécifique, par l'intermédiaire d'autant de co-aptations entre « domaines ». L'identification des domaines d'interaction effectifs d'une protéine ou nœud donné d'un réseau ou module comporte donc un intérêt majeur pour la compréhension en profondeur du fonctionnement de celui-ci. Or, il est possible, en principe, d'explorer systématiquement les domaines d'interaction d'une protéine.

Pour cela, il s'agira de concevoir et d'obtenir, pour chaque interacteur, une collection ordonnée de fragments peptidiques de longueurs variables. Ces fragments, raccourcis en N-terminal et/ou en C-terminal par rapport à la séquence protéique complète sont obtenus après délétions progressives et régulières de l'ORF correspondante et clonage dans un vecteur qui permet la création d'une ressource centrale. Dans le but de mettre en évidence les domaines d'interaction, chaque fragment de la protéine d'intérêt sera alors soumis à un test double-hybride pour sa capacité d'interaction avec un même partenaire protéique.

Aucune indication de domaine n'étant disponible pour les protéines prises en compte, nous avons opté pour une stratégie de génération systématique de fragments, qui doit donc obéir à certaines exigences pratiques. Les fragments protéiques que nous allons concevoir diffèrent entre eux par la taille, et ce par pas d'un certain nombre d'acides aminés. Le pas choisi correspond à une taille minimale probable d'un domaine protéique. L'ensemble des fragments représentera toutes les combinaisons de longueurs possibles obtenues après délétions de la protéine en N-terminal et/ou en C-terminal, et donc de l'ORF en 5' et/ou en 3'. En outre, la génération d'une telle collection de fragments sera réalisée suivant un schéma de disposition en matrice afin de les utiliser par la suite de manière organisée et facilement reproductible (Fig. 1a). Enfin, la localisation de chaque fragment dans la matrice permettra à elle seule d'en déterminer la taille et la position par rapport à la séquence protéique complète. De ce fait, il sera possible de déterminer, pour chaque protéine soumise à fragmentation, quel est le domaine minimal d'interaction - ou DMI - avec un partenaire donné, puisqu'il s'agira du plus court fragment qui conserve sa capacité d'interaction avec ce partenaire dans le test double-hybride.

Dans le cadre de l'approche « interacteurs-centrée » du module apoptotique de *C. elegans* décrite plus haut, nous allons donc fragmenter CED-4, F25F8.1 et SPD-5 et, pour chacune de ces protéines, tester la capacité d'interaction des fragments avec CED-9 afin de mettre en évidence leur domaine minimal d'interaction.

1.2. « Design » de matrices de délétions

Afin d'obtenir pour chacune des protéines à fragmenter une collection organisée de fragments d'ORF, nous avons conçu une matrice basée sur la disposition des amorces PCR « forward » et « reverse » en plaques 96-puits (Fig. 1b). Les amorces sont désignées de manière à être régulièrement espacées sur l'ORF. Ainsi, l'espace séparant deux amorces voisines est de 120 paires de bases dans le cas des ORFs de *ced-4* et F25F8.1 et de 150 paires de base sur l'ORF de *spd-5*. Cette dernière étant relativement plus longue que les ORFs de *ced-4* et F25F8.1 (3597 pb contre 1650 et 1893 paires de bases, respectivement), le pas choisi est plus important afin de construire une matrice de taille raisonnable, d'environ 200 à 400 éléments. De plus, le nombre de paires de bases séparant chaque amorce de la suivante est toujours un multiple de trois et respecte la phase de lecture. Chaque ligne de la matrice permet la combinaison d'une amorce « forward » avec chaque amorce « reverse », tandis que chaque colonne permet la combinaison d'une amorce « reverse » avec chaque amorce « forward ». Les produits d'amplification obtenus après réaction de PCR constituent une collection de fragments d'ORF. Par rapport à l'ORF complète (« full length »), les fragments sont délétés progressivement en 5' de haut en bas de la matrice, et en 3' de gauche à droite de la matrice. La différence de taille entre deux fragments voisins dans une même colonne ou dans une même ligne est égale à l'espace séparant les amorces « forward » ou « reverse », respectivement.

Une fois la collection de produits d'amplification générée, nous avons appliqué une stratégie de clonage assurant leur disponibilité, sous forme d'une ressource centrale de fragments (ou encore « fragmentome »), pour diverses applications expérimentales ultérieures³.

³ En ce qui concerne CED-4 et F25F8.1, seuls les tests des interactions ont été réalisés (voir le point 3.2.3 Tests des interactions) au cours de ce travail, les étapes précédentes ayant été réalisées précédemment au laboratoire.

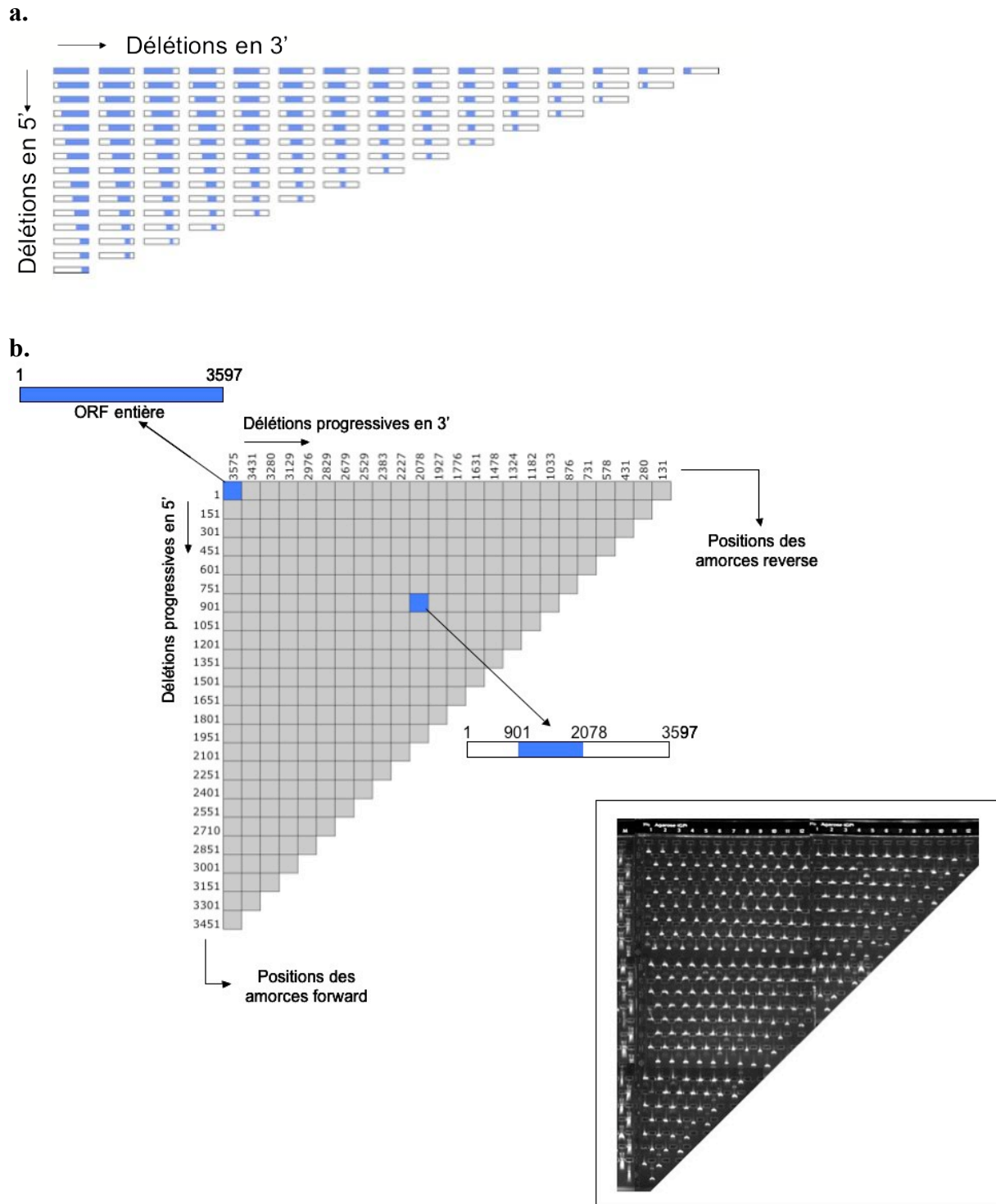


Fig. 1 : Illustration du concept de matrice de délétions

- a. Une ORF est découpée en fragments organisés en matrice et qui diffèrent par la taille, comme détaillé au point 1.2. L'ORF complète est représentée de 5' en 3' par un rectangle, et la partie de l'ORF toujours présente après délétion est représentée en bleu.
- b. La partie centrale de l'image représente la matrice de délétion de *spd-5*. La disposition des amorces « forward » et « reverse » est représentée, ainsi qu'un exemple de fragment, suivant le même code couleur qu'en a. La migration sur gel d'agarose des produits d'amplification PCR de la matrice de délétion de *spd-5* est encadrée. La diminution de taille des fragments, de gauche à droite et de bas en haut de la matrice, est observable. Les pistes de migration de l'étalon de poids moléculaire sont à gauche de la matrice.

2. Génération d'une ressource centrale « fragmentome »

Afin de disposer des fragments d'ORF de manière à bénéficier d'une flexibilité d'utilisation, nous les avons clonés via le système GATEWAY™. Les vecteurs d'entrée obtenus peuvent servir par la suite, pour le clonage des fragments en divers vecteurs d'expression.

2.1. Clonage des fragments PCR

2.1.1. Système de clonage GATEWAY™ : principe et avantages

La technologie GATEWAY™ est une méthode universelle de clonage basée sur les propriétés de recombinaison site-spécifique utilisées par le bactériophage λ pour s'intégrer dans le génome de *E. coli* et le « switch » entre les phases lytique et lysogénique (Hartley *et al.*, 2000). La recombinaison a lieu entre des sites d'attachement spécifiques (*att*) : *attB* sur le chromosome de *E. coli* et *attP* sur le chromosome du bactériophage. Les sites *att* servent de sites de liaison pour les protéines de recombinaison. Lors de l'intégration du phage λ , une recombinaison a lieu entre *attB* et *attP*, résultant en deux sites *attL* et *attR*. En réalité, le crossing-over a lieu entre des régions centrales homologues de 15 pb dans les deux sites, mais les séquences qui les bordent sont requises pour la liaison des protéines de recombinaison. La recombinaison est catalysée par une série d'enzymes qui lient les séquences spécifiques, rapprochent les sites cibles, les clivent et « liguent » l'ADN de manière covalente. Les protéines de recombinaison impliquées dans les réactions d'intégration (lysogénie) ou d'excision (lyse) sont reprises en Table 1.

Table 1

Phase	Réaction	Enzymes
Lysogénie	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	Int, IHF
Lyse	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	Int, IHF, Xis

L'intégrase (Int) et l'excisionase (Xis) sont fournies par le phage λ , tandis que l'« Integration Host Factor » (IHF) est une protéine de *E.coli*.

Dans la technologie GATEWAY™, les composants du système de recombinaison du phage λ ont été modifiés afin d'obtenir des paires de sites à spécificités distinctes et d'améliorer l'efficacité du système. Ainsi,

- les sites *attB1* ne recombinent qu'avec les sites *attP1*
- et de la même façon, *attB2* avec *attP2*, *attR1* avec *attL1*, et *attL2* avec *attR2*.

La Fig. 2 schématise les deux réactions de recombinaison qui sont à la base du système GATEWAY™.

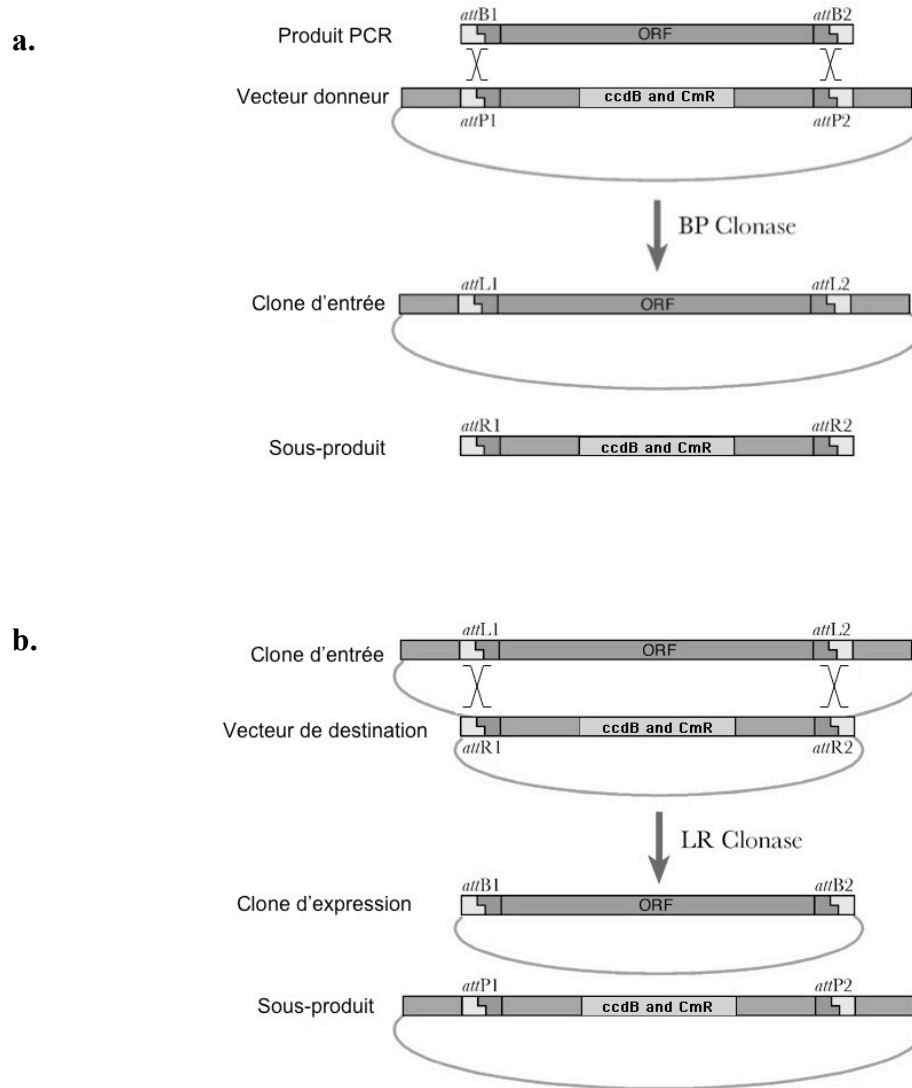


Fig. 2 : Schéma des réactions de recombinaison du système de clonage GATEWAY™.

- a.** La réaction BP permet la recombinaison d'un produit PCR-*attB* (le produit d'amplification PCR est flanqué de sites de recombinaison *attB*, fusionnés aux amorces PCR) avec un vecteur donneur contenant les séquences de recombinaison *attP*, pour générer un vecteur d'entrée contenant des sites *attL*. La réaction est catalysée par le « mix BP clonase » qui contient Int et IHF.
- b.** La réaction LR permet la recombinaison d'un clone d'entrée contenant un site *attL* avec un vecteur de destination contenant un site *attR*, pour générer un clone d'expression contenant un site *attB*. La réaction est catalysée par le mix « LR clonase », contenant Int, IHF et Xis.

Pour permettre le clonage par recombinaison et la sélection des clones d'entrée ou d'expression, les vecteurs utilisés contiennent deux sites *att* bordant une cassette qui contient :

- Le gène *ccdB* pour une sélection négative : la protéine CcdB interfère avec l'ADN gyrase d'*E. coli*, inhibant ainsi la croissance de souches bactériennes "*ccdB* sensibles". L'ADN gyrase de bactéries "*ccdB* résistantes" n'est pas affectée par CcdB.
- Le gène de résistance au chloramphénicol (*Cm^R*) pour une contre-sélection des non-recombinants

Après réaction BP ou LR, cette cassette - et par là le gène *ccdB* - est remplacée par l'insert pour générer un clone d'entrée ou d'expression, respectivement. Ainsi, seules survivent les bactéries *ccdB* sensibles qui ont été transformées et pour lesquelles la réaction de recombinaison a eu lieu.

2.1.2. Clonage des fragments en vecteurs d'entrée.

Une réaction BP a été réalisée, permettant la recombinaison entre les sites *attB* des produits PCR (les amorces utilisées pour la PCR sont GATEWAY-compatibles) avec les sites *attP* du vecteur donneur pDONR223 (Rual *et al.*, 2004).

Les produits de réaction obtenus sont alors transformés dans une souche de bactéries *ccdB* sensibles (Fig. 2a). De cette manière, seules les bactéries contenant un vecteur recombinant (c'est-à-dire dont la cassette contenant le gène *ccdB* a été remplacée par le produit PCR) seront capables de se multiplier. De plus, la spectinomycine ajoutée au milieu permet la sélection des bactéries contenant un plasmide, puisque pDONR223 porte le gène de résistance à la spectinomycine.

Les vecteurs d'entrée sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique (Fig. 2b). La collection, pour chacune des ORFs d'intérêt (*ced-4*, F25F8.1 et *spd-5*), des fragments organisés en matrice et clonés en vecteurs d'entrée sera appelée « fragmentome ».

2.2. Disponibilité de la ressource en tant qu'outil

La technologie GATEWAY™ permet, à partir des vecteurs d'entrée, le clonage de l'insert d'intérêt en vecteur d'expression. Ceci peut s'appliquer à de nombreux types de vecteurs d'expression, autorisant la fusion de l'insert à diverses étiquettes (par exemple GST et Myc) ou séquences codant des domaines d'interaction avec l'ADN ou de transactivation. Dès lors, à partir de la ressource « fragmentome⁴ », diverses applications sont envisageables.

Nous avons utilisé cette ressource dans une approche permettant l'analyse d'un sous-réseau de protéines menant à l'apoptose chez le nématode *C. elegans*.

⁴ Dans la suite de ce travail, nous considérons « un fragmentome » comme une ressource correspondant à la collection des fragments d'une ORF d'intérêt, clonés en vecteurs d'entrée. Trois fragmentomes seront donc réalisés dans le cadre de ce travail (pour CED-4, SPD-5, F25F8.1).

3. Utilisation de fragmentomes pour l'analyse du sous-réseau apoptotique de la lignée germinale de *C. elegans*

3.1. Question posée pour une étude « interacteurs-centrée »

Notre objectif est d'affiner la compréhension des interactions protéines-protéines dans le sous-réseau apoptotique de *C. elegans*, par une approche que nous avons qualifiée plus haut d'« interacteurs-centrée » ou « domain-based ». Celle-ci se veut complémentaire à l'approche « CED-9-centrée » ou « link-based », laquelle repose sur la sélection d'allèles défectifs pour une interaction. Nous avons pris comme point de départ la séquence nucléotidique des ORFs de ces interacteurs pour tenter d'obtenir des informations relatives aux domaines en jeu. La question que nous nous posons à ce stade est la suivante : pour chaque interacteur protéique envisagé, à savoir CED-4, F25F8.1 et SPD-5, quel est le domaine minimal d'interaction (DMI) avec l'acteur central CED-9 ?

Pour répondre à cette question, nous avons donc testé la présence d'une interaction entre CED-9 et chaque fragment de protéine généré à partir de CED-4, F25F8.1 et SPD-5, par la méthode du double-hybride en levure.

3.2. Identification des DMI par double hybride

3.2.1. Stratégie

La technique du double-hybride en levure en format haut-débit telle qu'utilisée pour établir l'interactome, a été choisie pour mettre en évidence des interactions physiques subsistant entre CED-9 et les fragments de chacune des protéines F25F8.1, CED-4 et SPD-5. Ce système qui a prouvé son efficacité pour détecter des interactions entre protéines, nécessite exclusivement la manipulation d'ADN. Il peut donc être facilement standardisé et automatisé. En fusionnant les fragments des protéines d'intérêt au domaine de transactivation (AD), et CED-9⁵ au domaine de liaison à l'ADN (DB), il sera possible de mettre en évidence une interaction éventuelle entre les deux.

3.2.2. Clonage de la ressource d'entrée en vecteur AD

La disponibilité des fragments d'ORFs en tant que clones d'entrée autorise leur fusion traductionnelle à la séquence codant le domaine de transactivation de Gal4p. Dans ce but, une réaction LR du système de clonage GATEWAY™ a été réalisée. Celle-ci a permis d'insérer les fragments d'ORF dans le vecteur de destination pDEST-AD, afin d'obtenir un vecteur d'expression contenant l'insert, fusionné en 5' à la séquence codant le domaine de transactivation de Gal4p. Les produits de réaction obtenus sont alors transformés en bactéries *ccdB* sensibles. L'antibiotique utilisé pour la sélection des bactéries transformantes est l'ampicilline, le vecteur pDEST disposant du gène de résistance correspondant. Les vecteurs d'expression sont récupérés par minipréparation d'ADN plasmidique (que l'on fait ensuite migrer sur gel d'agarose 1%, pour vérifier la présence et la taille de chaque fragment cloné en vecteur d'expression). CED-9 fusionnée en N-terminal au domaine de liaison à l'ADN Gal4p

⁵ Il s'agit en fait de CED-9ΔTM pour les raisons évoquées plus haut. Par simplicité, nous parlerons de CED-9 dans la suite.

a été obtenue en suivant les mêmes démarches de clonage que celles décrites pour le fragmentome de chaque ORF d'intérêt.

3.2.3. Tests des interactions

3.2.3.1. Co-expression en levure

Des levures transformées avec le plasmide contenant CED-9 en fusion avec DB sont ensuite co-transformées, en format 96-puits, avec chacun des fragments des ORFs d'intérêt en fusion avec AD. Chaque puits contient un fragment précis, et la disposition en matrice est conservée. Après réaction de co-transformation, les levures sont déposées sur milieu synthétique complet déplété en tryptophane (pour la sélection de la présence du plasmide contenant la fusion AD) et en leucine (pour la sélection du plasmide contenant la fusion DB). Seules les levures ayant été transformées avec les deux plasmides et capables de les répliquer, pourront croître sur ce milieu sélectif.

3.2.3.2. Mise en évidence des interactions

Les gènes rapporteurs sont tels que l'activation de leur transcription peut être détectée, soit visuellement, soit par sélection.

Nous avons tenu compte du phénotype relatif à deux gènes rapporteurs : *LacZ* et *HIS3*.

- *LacZ* : le phénotype est basé sur la détection colorimétrique (bleu-blanc) de la β -galactosidase (β -Gal) en réponse à l'activation du gène rapporteur *GAL1::lacZ*. La β -galactosidase, enzyme de dégradation du galactose, est également capable d'utiliser le X-Gal comme substrat. Lorsque celui-ci est clivé, un chromophore bleu est libéré. Autrement dit, les colonies qui deviennent bleues en présence de X-Gal expriment la β -galactosidase et donc, contiennent le facteur de transcription Gal4p reconstitué par l'interaction physique entre les deux protéines d'intérêt.
- *HIS3* : le phénotype est déterminé par un test de croissance (sélection positive). *HIS3* code l'enzyme imidazole-glycerol-phosphate déshydratase requise pour la biosynthèse de l'histidine. La sélection s'opère donc sur un milieu déplété en histidine. Le 3AT, agissant comme inhibiteur compétitif de l'activité enzymatique, est ajouté au milieu. La biosynthèse de l'histidine résultant de la transcription basale du gène *HIS3* est ainsi inhibée, ce qui permet de réduire le bruit de fond. Seules les levures exprimant *HIS3* (donc contenant le facteur de transcription Gal4p reconstitué par l'interaction physique entre les deux protéines d'intérêt) sont capables de pousser sur un milieu sélectif (sans histidine et avec 3AT).

Nous considérons une colonie comme positive si elle est bleue en test d'activité de la β -galactosidase et si elle pousse sur milieu sans histidine supplémenté en 3AT. De plus, ces candidats doivent être négatifs lors d'un test d'auto-activation.

3.2.3.3. Identification des fragments auto-activateurs

Pour éviter de considérer un candidat positif auto-activateur comme un interacteur réel de CED-9, nous avons réalisé les mêmes démarches que celles décrites ci-dessus, mais à partir de levures transformées uniquement avec les fragments fusionnés en AD (test « simple-hybride »). Il n'y a donc pas de co-transformation avec CED-9-DB. Dans ces conditions, les levures positives dans l'un ou l'autre test (β -Gal ou test de croissance sans histidine) sont considérées comme reflétant une activité d'auto-activateurs. Dans ce cas, les fragments de protéines, fusionnés au domaine de transactivation de Gal4p, se révèlent donc à eux seuls capables d'activer la transcription des gènes rapporteurs pris en compte, indépendamment d'une interaction avec la protéine de fusion CED-9-DB. Les candidats positifs dans les tests double-hybride et détectés comme auto-activateurs seront mentionnés, le cas échéant, dans les figures qui suivent.

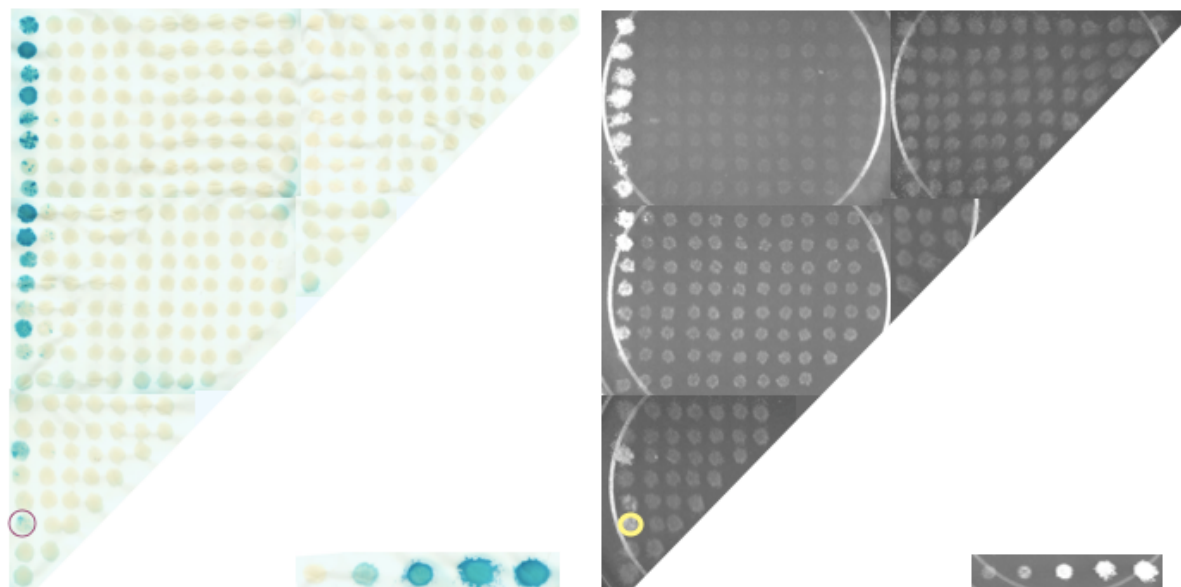
3.2.3.4. Détermination des DMI

Vu la disposition des fragments dans les matrices, il est possible de déterminer leur taille et leur situation par rapport à l'ORF complète en fonction de leur position dans la matrice. De plus, on sait que les ORFs sont progressivement délétées en 5' lorsqu'on se déplace de haut en bas dans la matrice, et en 3' si on se déplace de gauche à droite. Dès lors, parmi les candidats considérés comme positifs pour l'interaction en test de double-hybride, les plus petits fragments de F25F8.1, CED-4 ou SPD-5 qui sont toujours capables d'interagir avec CED-9 sont situés le plus à droite et vers le bas de la matrice. De cette manière, nous pouvons déterminer le domaine minimal d'interaction (DMI) avec CED-9, et ce pour chacun des trois interacteurs pris en compte.

a. DMI de SPD-5

Les résultats obtenus après le test d'activité de la β -galactosidase et le test de croissance sur milieu sans histidine avec 3AT, sont représentés en Fig. 3a. Les phénotypes sont consistants pour les deux gènes rapporteurs pris en considération. Le plus petit fragment de SPD-5 qui interagit encore avec CED-9 a une longueur de 148 acides aminés, et se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine (Fig. 3b). Il est impossible de déléter SPD-5 en C-terminal (c'est-à-dire l'ORF en 3') sans affecter son interaction avec CED-9.

a.



b.

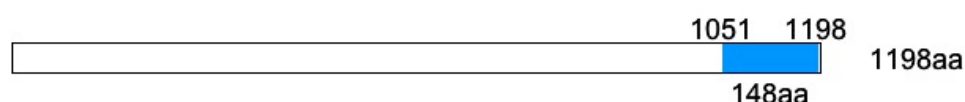


Fig. 3 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de SPD-5 et CED-9-DB.

- À gauche, test β -Gal, et à droite, test de croissance sur Sc -Leu -Trp -His +3AT. La représentation en matrice est comme à la Fig. 1. Le DMI de SPD-5 avec CED-9 se trouve dans la matrice à la position indiquée par les cercles mauve et jaune. Les cinq contrôles double-hybride (force d'interaction croissante de gauche à droite, voir la section « Matériels et Méthodes ») sont présentés en bas des matrices.
- Représentation schématique de la séquence protéique de SPD-5 (N-terminal à gauche et C-terminal à droite) ; le rectangle est la séquence entière (sa longueur en acides aminés est indiquée à droite), et le DMI de 148 acides aminés est en bleu (ses limites et sa longueur en acides aminés sont indiqués dessus et dessous, respectivement).

b. DMI de CED-4

Ici aussi, les deux phénotypes observés sont consistants (Fig. 4a). Contrairement à SPD-5 dont le DMI est très réduit côté C-terminal, CED-4 ne peut subir une délétion que de 80 acides aminés en N-terminal pour conserver son interaction avec CED-9 (Fig. 4b).

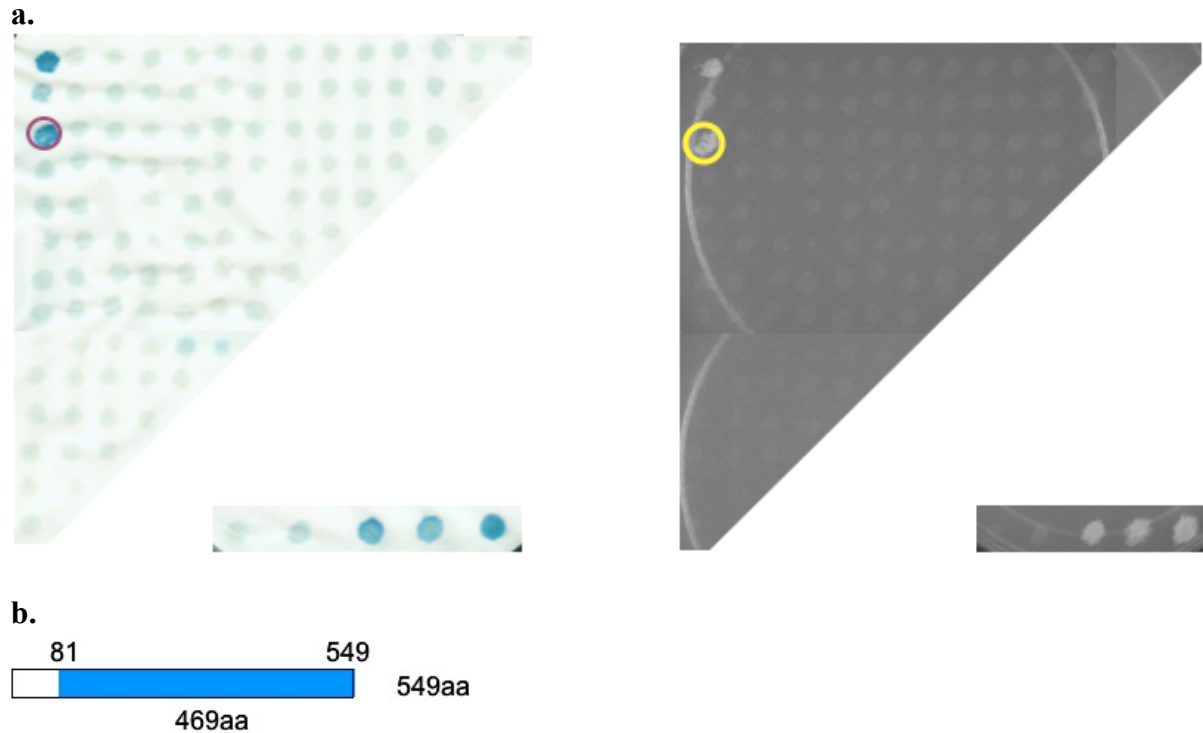


Fig. 4 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de CED-4 et CED-9-DB.

Le DMI trouvé pour CED-4 est de 469 acides aminés, du côté C-terminal de la protéine. Le reste est comme indiqué à la Fig. 4.

c. DMI de F25F8.1

Nous obtenons pour les fragments de F25F8.1 le même genre de résultats que pour CED-4, à savoir un domaine minimal d'interaction avec CED-9 couvrant la quasi totalité de la protéine (Fig. 5b). Dans le cas de F25F8.1, cependant, la délétion qui donne lieu à ce fragment se situe en C-terminal (en 3' sur l'ORF). Les trois clones positifs dans le milieu de la matrice (Fig. 5a) ont été testés positifs en test d'auto-activation, et ne sont donc pas à considérer.

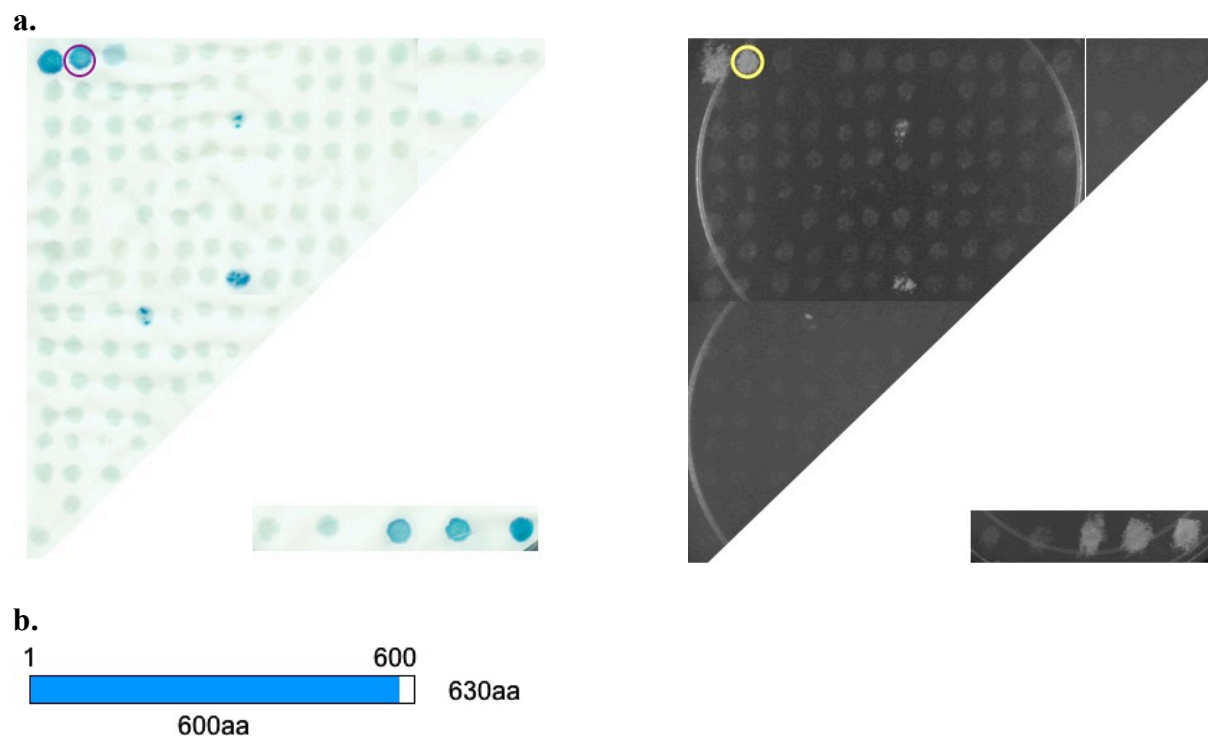


Fig. 5 : Phénotypes double-hybride des levures (MaV103) co-transformées avec les fragments-AD de F25F8.1 et CED-9-DB.

Le DMI trouvé pour F25F8.1 est de 600 acides aminés, du côté N-terminal de la protéine. Le reste est comme indiqué à la Fig. 4.

*
* *

En résumé, nous pouvons condenser ces résultats de la manière suivante (Table 2) :

Table 2 :

Interacteur de CED-9	Longueur de la protéine (aa) / de l'ORF (nt)	Position du DMI (aa)	Longueur du DMI (aa)
SPD-5	1198 / 3597	1051-1198	148
CED-4	549 / 1650	81-549	469
F25F8.1	630 / 1893	1-600	600

Au départ de la carte des interactions physiques établie au sein de l'interactome de *C. elegans*, nous nous sommes attardés à une portion de cet espace protéique, susceptible de contenir ce que nous avons défini comme un « module fonctionnel ». La machinerie moléculaire choisie fait intervenir des protéines ayant un rôle connu ou hypothétique dans l'apoptose ainsi que leurs proches interacteurs déterminés par des cribles de double-hybride en levure. L'approche que nous avons choisie se veut originale dans le sens où l'objectif est de déduire des informations qui relèvent du niveau des domaines d'interaction et par là, de décortiquer les « liens » entre les « nœuds » du sous-réseau apoptotique. Pour l'acteur que nous considérons comme central dans le module étudié, à savoir CED-9, une technique de sélection d'allèles défectifs pour une interaction (IDA) après mutations ponctuelles avait déjà permis de mettre au jour certains domaines d'interactions ou en tout cas les sites potentiels de liaison de partenaires protéiques sur CED-9. Cette méthode, bien qu'élégante et efficace, est relativement lourde à mener. La question était donc de savoir s'il était possible, par une autre stratégie et sans disposer des structures tridimensionnelles, d'obtenir des informations sur les domaines d'interactions au départ cette fois de trois interacteurs de CED-9. La méthode systématique utilisée dans le cadre de ce travail est basée sur la conception et la construction, pour chaque interacteur, d'une « matrice de délétions ». Chaque fragment de la collection ainsi obtenue, après clonage dans un système de vecteurs adéquat, a alors été testé par double-hybride en levure pour sa capacité à interagir avec CED-9. Les fragments d'une même protéine différant entre eux par leur longueur, et étant disposés dans la matrice en fonction de ce paramètre, les « domaines minimaux d'interaction » ont pu être déterminés pour chacun des trois interacteurs de CED-9 considérés.

1. Discussion générale des résultats

1.1. Preuves de principe

La dissection en fragments d'une protéine pour l'étude des interactions au sein du module apoptotique a été réalisée précédemment par Otilie *et al.* (1997, Fig. 1), cités en introduction et dont s'inspire notre approche. Nos résultats sont consistants avec les données obtenues par Otilie *et al.* concernant la détermination du domaine d'interaction de CED-4 avec CED-9. En effet, le DMI que nous avons déterminé pour CED-4 correspond relativement bien au domaine de liaison de CED-4 avec CED-9 cartographié par ces auteurs (aa 81-549, contre aa 91-549 pour Otilie *et al.*). La technique utilisée repose également sur l'analyse de fragments de CED-4 par double-hybride, ceux-ci n'étant cependant pas générés de manière systématique en grand nombre, comme nous l'avons fait, mais « dispersés » sur la séquence protéique, sans *a priori*.

Par ailleurs, des résultats antérieurs des tests sur TIR-1 confirment l'efficacité d'une technique systématique de délétions combinée à des tests double-hybride pour la mise en évidence de domaines d'interaction (Fig. 2). La protéine TIR-1 a été fragmentée au laboratoire (Milstein & Vidalain, communication personnelle) et les fragments ont été testés en double-hybride pour leur interaction avec TIR-1 elle-même et avec KGB-1. Le domaine minimal d'homodimérisation (DMH) et le DMI avec KGB-1 ont ainsi pu être définis. Ces « DMI » et « DMH » correspondant à des régions identifiées sur la structure prédite du gène, la validité de leur mise en évidence par la technique de fragmentations systématiques est renforcée.

Des travaux reposant sur un système double-hybride sans fragmentations préalables ont aussi permis la mise en évidence de domaines d'interactions. Par exemple, la technique utilisée par Kawarasaki *et al.* (2002) associe le double-hybride en levure à une méthode de cartographie

de domaines de liaison protéine-protéine par l'amplification préférentielle par PCR de l'amplicon le plus court (PASA-PCR).

1.2. Pertinence biologique

Toute approche à haut-débit comporte son lot de faux positifs et de faux négatifs. En effet, la situation du double-hybride sur fragmentome est essentiellement celle du double-hybride classique. Trois points sont discutés ici. Les deux premiers sont relatifs au système double-hybride puisqu'il s'agit des faux positifs et du caractère exhaustif de l'analyse. Le dernier point est lié au concept de fragmentations.

1.2.1. Faux positifs

Comme déjà évoqué, on ne peut exclure la possibilité qu'une partie des candidats en test double-hybride soient en réalité des faux-positifs. Trois cas de faux positifs sont à considérer : les candidats positifs étant capables d'activer la transcription du gène rapporteur, soit indépendamment de toute interaction avec la seconde protéine de fusion (auto-activation), soit par l'intermédiaire d'une protéine interne au système assurant la liaison des deux protéines de fusion (« triple hybride »), soit reflétant une interaction impossible *in vivo* (temporellement ou spatialement). Un peptide de fusion répond illégitimement, c'est-à-dire à l'inverse du comportement qu'il présente *in vivo*, pour des raisons intrinsèques (puisqu'il s'agit d'un mutant de fusion et/ou de fragmentation) ou extrinsèques aux protéines de fusion testées. Une partie de ces faux positifs peut être discriminée par des tests d'auto-activation « simple-hybride ». Le fait que les fragments raccourcis progressivement jusqu'au DMI soient positifs (en tout cas pour la plupart, voir plus loin) serait un argument en faveur de l'interaction effective de ces fragments avec le partenaire protéique, puisque depuis la protéine entière (candidat positif en double-hybride vérifié dans d'autres systèmes) jusqu'au DMI, l'interaction pourrait être maintenue. Par ailleurs, le fait même que l'interaction testée entre la protéine non fragmentée et un partenaire protéique ait été confirmée par co-AP élimine les possibilités de faux positifs (pour la protéine entière) dus au système double-hybride en levure en lui-même. Une co-localisation de l'expression de ces deux partenaires (visualisée par hybridation *in situ* des ARNm) suffit quant à elle à éliminer les possibilités de faux positifs qui reflètent une interaction impossible *in vivo* des points de vue de la localisation et du moment d'expression. Le double-hybride reste une technique proposant des candidats qui devront être testés par ailleurs dans d'autres systèmes.

1.2.2. Caractère exhaustif de l'analyse

La question posée ici concerne la couverture des domaines par la méthode systématique utilisée. Le fait de retrouver en nombre des fragments positifs co-localisés en une région dans la matrice montre que tout domaine devrait avoir été identifié au moins par quelques fragments positifs. De plus, des fragments positifs isolés dans la matrice ne sont pas observés (si ce n'est certains cas qui ont été considérés comme faux-positifs de type auto-activateurs), ce qui suggère que le crible a été « saturant ». Parmi les causes possibles d'un biais des résultats, nous évoquons ici les faux négatifs, c'est-à-dire les fragments protéiques capables d'interagir *in vivo* mais non détectés en double-hybride pour des raisons « techniques » ou « biologiques ». Un exemple d'échec « technique » d'une interaction serait celui où le système d'identification de double-hybride en levure utilisé est incapable de donner lieu à une interaction (pourtant bien réelle *in vivo*). Ceci peut être dû à la présence ou à l'absence d'un élément particulier, par exemple un troisième partenaire responsable d'une modification post-traductionnelle. Des caractéristiques intrinsèques à la protéine ou à ses fragments peuvent

aussi être en cause et on parle alors de faux négatifs « biologiques ». On peut considérer parmi ceux-ci les fragments protéiques qui constituent un domaine d'interaction *in vivo* avec l'appât d'intérêt mais qui ne sont pas capables d'auto-repliement. Autrement dit, ils ne peuvent adopter leur structure tridimensionnelle sans être placés dans l'environnement particulier constitué par la protéine entière (et ce indépendamment de la séquentialité des résidus concernés).

Contrairement à certains faux positifs, les faux négatifs sont difficilement identifiables et leur nombre est inconnu. Cependant, il faut rappeler que le système double-hybride a fait ses preuves pour ouvrir des possibilités d'investigations ultérieures, en fournissant une première « liste » non exhaustive de candidats qui peuvent être testés par la suite dans des systèmes différents. Des recherches d'interacteurs plus poussées peuvent être réalisées pour détecter, éventuellement par d'autres méthodes, des partenaires qui étaient faux négatifs lors de l'analyse préliminaire. Il est probable que notre technique de définition de DMI ne permette pas de détecter tout fragment interacteur mais elle constitue une première approche pour déterminer et délimiter ces domaines.

1.2.3. Questions de stabilité et de conformation des fragments

Il paraît évident qu'un DMI et la protéine dont il est issu constituent deux contextes d'interaction différents. Même si le contexte dans lequel cette interaction a lieu est différent du contexte original, l'interaction entre le DMI et le partenaire protéique (par exemple entre le DMI de SPD-5 et CED-9) est pourtant bien réelle. En effet, le DMI n'est pas auto-activateur et les résultats des différents tests phénotypiques sont consistants entre eux. Toute interaction double-hybride, par les fusions qu'elle implique, a lieu dans un environnement différent par rapport à la situation *in vivo*. La stabilité et la conformation des protéines et/ou fragments testés sont des paramètres importants à ce sujet et sont discutés ici.

Dans une matrice, bien que les longueurs des fragments voisins diffèrent peu, ceux-ci n'en sont pas pour autant identiques. La perte d'une série de 40 ou 50 acides aminés par rapport au fragment voisin pourrait changer radicalement la conformation, et donc la fonctionnalité de la protéine. À titre d'illustration, imaginons qu'une délétion à une extrémité du peptide favorise le mouvement d'une boucle qui va « masquer » une partie des acides aminés nécessaires à l'interaction. Le résultat double-hybride sera négatif. Par contre, si on continue à raccourcir le peptide à partir de cette même extrémité, on peut envisager la disparition ou un mouvement supplémentaire de la boucle, de sorte que l'interaction soit à nouveau possible et détectée. C'est ce qui est observé pour les résultats des tests double-hybride de la matrice de fragments de SPD-5 contre CED-9, dans laquelle on voit le maintien de l'interaction dans la première colonne jusqu'à la position du DMI, sauf pour quelques positions. La Fig. 3 tente de schématiser cette possibilité en termes de relations logiques positives ou négatives sur l'adoption d'une configuration efficace entre les portions de peptides délétés.

Un cas particulier des changements de conformations du peptide suite à une délétion est une modification dans la stabilité de celui-ci. Par exemple, un acide aminé ou une suite d'acides aminés placé à une extrémité de la protéine pourrait constituer un site reconnu par des enzymes de dégradation. De plus, la conformation du peptide peut être telle que des résidus situés ailleurs qu'aux extrémités soient mis à jour par rapport à la conformation de la protéine complète et, de ce fait, soient également reconnus par un système enzymatique de dégradation.

La détermination de la présence des peptides pourrait être réalisée par Western Blot (dans la mesure où les anticorps primaires utilisés pour la révélation seraient par exemple dirigés contre un « tag » préalablement fusionné à chaque fragment d'intérêt par le clonage des clones d'entrée dans le vecteur d'expression approprié). Une discrimination des deux

hypothèses envisagées ci-dessus serait alors possible, puisque l'absence de peptides serait à mettre en relation avec leur dégradation ou une perte de leur stabilité.

1.3. Retour à la question de fonction

En introduction de ce travail, la question de fonction a été mise en relation avec le concept de modules fonctionnels. L'alternance des connexions entre ceux-ci assurerait la complexité croissante des fonctions cellulaires ou d'un organisme et favoriserait l'adaptation aux stimuli. Nous avons également suggéré l'importance des domaines comme unités fonctionnelles, adaptatives et évolutives des protéines. Celles-ci seraient issues de la combinatoire d'unités de base, les domaines, leur conférant une variété de fonctions plus complexes que celles des domaines individuels, de la même façon que se construit un réseau d'interactions protéiques. L'établissement et la disponibilité d'une carte d'interactome à l'échelle des domaines (Moon *et al.*, 2005) pourrait fournir des informations sur les fonctions, comme déjà suggéré en Fig. 23 de l'introduction. De plus, on peut imaginer pouvoir en soutirer des données évolutives, les domaines étant un « niveau » avant celui des protéines, lui-même étant avant celui des modules, etc... À ce sujet, Bornberg-Bauer *et al.* (2005) ont décrit un processus évolutif qui pourrait jouer un rôle majeur dans le développement d'interfaces d'interactions. Les gènes codant deux protéines, typiquement deux protéines à un seul domaine, seraient d'abord « fusionnés » en un seul gène. L'interaction physique entre ces deux domaines évoluerait alors vers une plus grande stabilité, par exemple *via* la mise en place d'interactions hydrophobes. Si, après de nombreuses générations, les protéines se trouvent à nouveau isolées, l'interface hydrophobe pourrait être maintenue comme surface de reconnaissance spécifique des deux protéines séparées. Ce processus a été qualifié de méthode de la « pierre de Rosette ». Le terme de « pierre de Rosette » ne nécessite pas forcément une interaction. Deux gènes qui n'interagissent pas directement, mais qui sont co-régulés, pourraient subir un événement de fusion qui résulterait en une co-régulation plus forte (Fig. 4). Des hypothèses en terme d'évolution des réseaux pourraient ainsi être émises à partir de données sur des domaines d'interactions.

Un exemple d'hypothèses qui peut être émise sur le fonctionnement d'un nœud dans un réseau suite à des données sur sa composition en domaine fonctionnels est donné ici.

Nous avons recherché une éventuelle homologie avec une région connue (avec le programme BLAST ; Altschul *et al.*, 1990) pour les séquences protéiques de chacun des DMI et chacun des « plus longs domaines qui n'interagissent pas ». Il apparaît que le plus long domaine de CED-4 dispensable à l'interaction avec CED-9 (c'est-à-dire la séquence complète de CED-4 sans le DMI) correspond au domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain ; Hofmann, 1997) (Fig. 5). La partie N-terminale serait responsable du recrutement et de l'activation des caspases (en l'occurrence CED-3) et la partie C-terminale (DMI) contiendrait les résidus essentiels à l'interaction avec CED-9. Ceci suggère que CED-4 serait conceptuellement et physiquement séparable en deux, et donne un « sens » biologique au DMI trouvé (par la cohérence de sa position sur CED-4 par rapport à ce qu'on attend de la multifonctionnalité de cette protéine).

1.4. Deux catégories de domaines sont définies à partir des DMI mis en évidence

Comme mentionné plus tôt, on peut concevoir deux grandes classes de domaines dans le contexte d'un « mapping » tel que celui que nous avons réalisé. En effet, les DMI définis au cours de ce travail semblent tomber dans deux catégories, telles que celles qui différencient les épitopes « conformationnels » des épitopes « séquentiels ». Les DMI relativement

« courts » (comme par exemple celui de SPD-5 avec CED-9) correspondraient à des domaines « séquentiels », tandis que les DMI qui recouvrent la quasi totalité de la longueur de la séquence protéique indiqueraient que le domaine d'interaction recherché est un domaine « conformationnel ». Du point de vue des domaines d'interaction recherchés, CED-4, F25F8.1 et CED-9 (pour laquelle un fragmentome avait été réalisé précédemment au laboratoire) seraient qualifiées de protéines « non fragmentables » tandis que SPD-5 serait « fragmentable ». Dans cette dernière catégorie, nous pouvons signaler TIR-1, évoquée plus haut et pour laquelle les résultats double-hybride contre un interacteur connu et contre elle-même permettent de définir des domaines qui semblent correspondre à la catégorie « séquentielle ». En termes évolutifs, on suppose que des molécules nucléotidiques, et en particulier des ARN, aient précédé l'apparition des molécules peptidiques comme catalyseurs. La pression de sélection s'exercerait à ce stade surtout sur la séquence. Suite à l'apparition des protéines, il est possible qu'elle s'exerce alors sur la structure tridimensionnelle, d'où l'existence de domaines séquentiels et conformationnels, éventuellement dans une même protéine. Une illustration « technologique » de protéines contenant des domaines conformationnels et séquentiels (et donc fragmentables ou non en fonction du domaine considéré) est celle des protéines de fusion. Par exemple, CED-9-DB est fragmentable en deux parties fonctionnelles (la protéine CED-9 et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p), mais non fragmentable s'il s'agit de déterminer des domaines d'interaction minimums de CED-9 avec ses partenaires protéiques par la méthode d'analyse systématique d'une collection de fragments en double-hybride.

En résumé, nous pensons pouvoir distinguer deux catégories de domaines, et donc deux catégories de protéines en fonction de leur contenu en domaines. Des domaines qualifiés de conformationnels ne pourront être définis par une méthode de fragmentations systématiques, même s'il est envisageable de pouvoir ainsi « encadrer » leur position sur la protéine. Le DMI sera surestimé pour cette catégorie de domaines, puisque la perte de résidus non nécessaires pour l'interaction en tant que telle, mais intervenant dans le rapprochement ou la conformation des résidus impliqués, pourra donner lieu, indirectement, à une perte de l'interaction. Des domaines dits séquentiels pourront par contre être définis plus précisément par une telle approche. Nous pensons donc que la méthode utilisée peut permettre une discrimination grossière des deux types de domaines, sans *a priori* de structure tridimensionnelle ou de régions conservées.

*

* *

Les DMI proposés pour les protéines CED-4, SPD-5 et F25F8.1 sont soumis aux critiques inhérentes au système double-hybride. En outre, même si le domaine correspondant est séquentiel, il « répondra » de manière variée à l'environnement (dont le test double-hybride lui-même). La technique utilisée, appliquée sans *a priori* et systématiquement, propose donc des candidats, comme déjà signalé, dont la pertinence biologique devra être validée par d'autres évidences.

2. Perspectives

2.1. Prérequis à l'obtention d'une carte des domaines pour le module apoptotique

Avant de pouvoir disposer de cartes de « domaine-domaine interactome » complètes pour des sous-réseaux donnés, de nouveaux interacteurs protéiques doivent encore être découverts. Concernant le sous-réseau apoptotique, il semblerait en effet que des informations manquent, notamment en ce qui concerne les protéines pro-apoptotiques responsables de la perte de l'interaction CED-9-CED-4 et donc du déclenchement de la voie d'exécution. Nous avons mentionné plus haut le rôle des protéines pro-apoptotiques EGL-1 et CED-13 dans l'activation de la voie d'exécution apoptotique dans les cellules germinales en cas de dommage à l'ADN. Leur rôle dans l'induction de l'apoptose physiologique de ces mêmes cellules n'est pas clair. Pour identifier de nouveaux acteurs pro-apoptotiques potentiels, on envisage d'appliquer la méthode d'expression de trois éléments en levure qui a permis la sélection des allèles CED-9 (ida^{EGL-1-}) décrite plus haut. Un crible reposant sur cette technique et utilisant l'ORFéome ou la banque de cDNA de *C. elegans* comme « troisième élément » pourrait mettre en évidence des protéines capables de déplacer l'interaction entre CED-9 et CED-4, et donc probablement responsables de l'activation de la voie d'exécution.

2.2. Application de l'approche « interacteurs-centrée » plus loin dans le réseau : expérience préliminaire

Nous nous sommes focalisés, au cours de ce travail, sur les domaines d'interactions de trois protéines avec CED-9. On peut appliquer cette approche « interacteurs-centrée », non plus en s'intéressant aux liens avec CED-9, mais aux interactions avec d'autres acteurs protéiques du sous-réseau considéré. En effet, il est envisageable de « voyager » d'interacteur en interacteur sur un espace protéique donné, jusqu'à établir, *in fine*, une carte d'interactions entre domaines. Les « DMI » seraient alors les « nœuds » qui sous-tendent le réseau. Aussi, disposant d'un fragmentome pour trois protéines du module « apoptose », il est possible de tester chacun des fragments par double-hybride contre des interacteurs de ces trois protéines. Un crible double-hybride « de seconde génération » avait mis en évidence des interacteurs de F25F8.1 (Dreze & Vidalain, communication personnelle). Entre autres, F25F8.1 est capable d'interagir avec elle-même (interaction d'homodimérisation). En vue de déterminer le domaine minimal d'homodimérisation (DMH), nous avons testé en double-hybride l'interaction éventuelle entre chacun des fragments de F25F8.1 fusionnés au domaine AD de Gal4p et la protéine F25F8.1 entière fusionnée au domaine DB de Gal4p, selon la technique déjà décrite. Les résultats obtenus sont consistants pour les deux tests et repris en Fig. 6 ci-contre.

De cette manière, nous avons pu définir le DMH de F25F8.1. Celui-ci est commun avec une partie du DMI de F25F8.1 avec CED-9 et est relativement plus court que celui-ci (600 acides aminés pour le DMI, contre 240 acides aminés pour le DMH ; Table 1 et Fig. 7). Ces résultats suggèrent que F25F8.1 ne pourrait pas simultanément interagir avec CED-9 et homodimériser. Ce genre d'hypothèse n'aurait pu être émise si l'interaction n'avait pas été étudiée au niveau des domaines.

Récemment au laboratoire, une autre protéine a été mise en évidence pour sa capacité d'interaction avec F25F8.1 dans le contexte d'un crible de double-hybride en levure. Il s'agit

de SAS-5, protéine centriolaire requise pour la duplication du centrosome chez *C. elegans* (Delattre *et al.*, 2004). Cette interaction établit un lien physique supplémentaire entre les machineries moléculaires « apoptose » et « mitose », parallèlement à l'interaction déjà évoquée entre CED-9 et SPD-5. La caractérisation fine de l'interaction entre F25F8.1 et SAS-5 par la détermination des domaines d'interaction est envisagée. Les tests double-hybride en levure de chacun des fragments de F25F8.1 contre SAS-5 sont en cours.

Nous avons évoqué des cribles double-hybride permettant, à partir de nœuds connus du sous-réseau utilisés comme « appâts », d'élargir celui-ci en identifiant de nouveaux interacteurs. Or, on peut aussi réaliser des cribles double-hybride en utilisant comme appâts les DMI déterminés pour chaque protéine avec chacun de ses interacteurs. Nous avons réalisé un crible utilisant le DMI de SPD-5 en appât et la banque d'ADNc de *C. elegans* en proie. Cependant, aucun candidat du crible re-testé comme positif ne semble présenter d'homologie avec un gène connu ou présumé. Nous attendions de ce crible la « preuve » de l'interaction avec CED-9, si celle-ci avait été trouvée comme « proie ». Un second crible est en cours, l'ORFéome de *C. elegans* faisant cette fois office d'« appât ». L'ORFéome étant standardisé (c'est-à-dire sans biais dû à la sous- ou sur-expression de certains transcrits) contrairement à la banque d'ADNc, CED-9 pourrait être détecté comme interacteur du DMI de SPD-5.

2.3. Validation des DMI en dehors du système double-hybride conventionnel

2.3.1. Vérification de la spécificité du DMI pour l'interaction analysée

Pour confirmer la spécificité pour l'interaction concernée d'un DMI, on peut réaliser une mutation compensatoire (Parrish *et al.*, 2000). Considérons par exemple le DMI de SPD-5 avec CED-9. Ce fragment peut être muté aléatoirement et ponctuellement (par exemple par PCR), cloné dans un vecteur permettant la fusion au domaine AD et exprimé dans des levures transformées avec l'allèle CED-9 (*ida*^{SPD-5}) fusionné à DB. Dans un contexte double-hybride, on retrouvera une interaction entre CED-9 et le DMI muté de SPD-5 à condition que la mutation sur le DMI compense celle de CED-9.

2.3.2. Les DMI comme outil pour des études « edgétiques » in vivo

Une des utilisations possibles de la ressource « fragmentome » d'une protéine d'intérêt (en tant que collection systématique de fragments d'ORF disponibles en vecteurs d'entrée), et en particulier du DMI déterminé pour chacune, est de tester leur capacité à perturber une interaction. En effet, on pourrait tester la capacité d'un DMI surexprimé à déplacer l'interaction entre la protéine entière et son interacteur, par exemple par compétition. Ceci pourrait être effectué *via* le système d'expression de trois éléments en levure explicité en introduction. Une fois la perte de l'interaction suite à la surexpression du DMI prouvée en levure, on peut envisager de « casser » le lien *in vivo*, et d'observer le phénotype éventuel. On aura alors perturbé un réseau *in vivo*, sans affecter la fonction de « nœud » d'une protéine ni les liens établis avec ses partenaires protéiques éventuels, mais en supprimant une seule interaction à l'aide d'un « dominant négatif » (Ito *et al.*, 2002). De plus, cette utilisation des DMI dans un système autre que celui du double-hybride conventionnel pourrait constituer une validation de leur pertinence biologique.

Un tel projet viserait donc d'abord à surexprimer le DMI de SPD-5 avec CED-9 en levure. Ces levures seront transformées avec CED-9-DB et SPD-5-AD, et le DMI sera cloné dans un vecteur permettant son expression en levure et son adressage vers le noyau, pour pouvoir visualiser la perte de l'interaction CED-9-SPD-5, comme décrit plus haut (Fig. 8a). Dans le

cas où le DMI de SPD-5 avec CED-9 serait effectivement responsable de la perte du lien concerné, il sera testé chez *C. elegans*. Dans ce but, le DMI sera cloné dans des vecteurs « heat-shock » HSP41 et HSP2, caractérisés par deux promoteurs différents qui permettent l'expression dans la quasi-totalité du ver. Les vecteurs seront introduits dans les cellules de la lignée germinale par micro-injection, en co-injection avec *rol-6* (codant un dominant négatif du collagène ayant pour phénotype un mouvement non coordonné du ver) de façon à vérifier visuellement la présence des vecteurs et leur expression (à température permissive). Le phénotype éventuel observé serait particulièrement intéressant puisqu'il serait dû à la perte d'un lien probablement important entre la mitose et l'apoptose (Fig. 8b).

Il est possible qu'un lien (voire plus) subsiste entre ces deux modules par l'interaction entre SAS-5 et F25F8.1, mais en tout les cas, la perturbation *in vivo* de l'interaction entre CED-9 et SPD-5 serait un premier pas dans la compréhension des connexions entre machines moléculaires. Ce type d'approches « edgétiques », c'est-à-dire de perturbation de liens spécifiques d'un réseau, par exemple *via* l'utilisation de DMI comme « dominants négatifs » pourrait, à terme, être exploitée pour des objectifs d'ordre thérapeutique. L'apoptose étant impliquée, notamment chez l'homme, dans nombre de cancers, la compréhension de ce module mais également sa manipulation *in vivo* par les approches explicitées, pourraient constituer un voie supplémentaire pour la recherche, tant du point de vue fondamental que thérapeutique.

2.4. Perturbations du module apoptotique dans le contexte de la relation hôte-parasite

Il est connu que certains pathogènes induisent chez la cellule hôte des modifications de certains processus physiologiques, notamment en activant ou en inhibant certaines machineries moléculaires, et ceci à l'avantage de l'hôte ou du parasite. Ainsi, *Brucella melitensis* inhibe l'apoptose des cellules hôtes par des mécanismes moléculaires encore méconnus (Gross *et al.*, 2000). *Mycobacterium tuberculosis* inhibe l'apoptose des monocytes (Durrbaum-Landmann *et al.*, 1996) mais peut également stimuler l'apoptose des macrophages alvéolaires (Keane *et al.*, 1997). L'inhibition de l'apoptose induite par un pathogène pourrait permettre à celui-ci de se servir de la cellule hôte comme d'un véhicule, de milieu protégé du système immunitaire ou de source énergétique par exemple. L'activation de l'apoptose en cas d'infection peut permettre d'éviter la propagation du pathogène, mais on peut aussi imaginer qu'il soit à l'avantage de celui-ci de stimuler l'apoptose de macrophages pour détruire la première ligne de défense du système immunitaire.

Il est probable que les pathogènes qui « manipulent » l'apoptose (et autres modules cellulaires) visent particulièrement certains types de nœuds, soit des « hubs » (dont une attaque ciblée aurait des effets dévastateurs), soit des nœuds moins connectés mais assurant une fonction précise ou essentielle (par exemple situés sur les « highways » entre modules ou indispensables dans une voie de transduction), voire même certains types de liens. Il semblerait en effet que les parasites maîtrisent mieux que nous la biologie des systèmes et la complexité des fonctions cellulaires. Pour espérer contrer ou empêcher les perturbations induites par ces pathogènes il est indispensable d'avoir une connaissance suffisamment précise des liens entre les nœuds qui constituent l'architecture du réseau ou sous-réseau d'intérêt. Il est important aussi de pouvoir prédire l'effet de perturbations de ces liens, par exemple *via* des approches systématiques permettant l'analyse des phénotypes edgétiques. Nous pensons donc que l'analyse des sous-réseaux permet de comprendre les stratégies optimisées de manipulation par des pathogènes. Et inversement, la compréhension au plan moléculaire de l'intervention bactérienne dans un réseau pourrait constituer un moyen d'appréhender la complexité de celui-ci.

1. Protocoles

1.1. Clonage des ORFs

Note : cette partie concerne particulièrement la génération du fragmentome de SPD-5, les fragmentomes de CED-4 et F25F8.1 ayant été réalisés précédemment, et ce de manière similaire.

1.1.1. Design des amorces

Les amorces GATEWAY™ compatibles ont été désignées selon les critères du fabricant (Invitrogen).

amorce	Sequence de 5' en 3'
Forward	G GGG ACA ACT TTG TAC AAA AAA GTT GGC ATG XXX
Reverse	GGG GAC AAC TTT GTA CAA GAA AGT TGG GTA XXX XXX

1.1.2. PCR (Réaction en Chaîne de la Polymérase)

1.1.2.1. Protocoles :

Novagen/Tokyobo KOD polymérase

Protocole appliqué pour la génération d'un fragmentome (les amorces sont réparties préalablement dans les puits, et un mélange général est ensuite préparé et ajouté aux amorces).

Composant	Volume (µL/réaction)
10X Buffer	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO ₄	3
Amorce Forward (2 µM)	5
Amorce Reverse (2 µM)	5
ADN (25 ng par réaction)	0.06
KOD (1 U/µL)	1 (1 U)
ddH ₂ O	qsp 50

Taq HIFI polymérase

Protocole appliqué pour les autres réactions de PCR :

Amorces	Séquence (de 5' en 3')
Y2H-AD	CGC GTT TGG AAT CAC TAC AGG G
Y2H-DB	GGC TTC AGT GGA GAC TGA TAT GCC TC
Y2H-Term	GGA GAC TTG ACC AAA CCT CTG GCG

Composant	Volume (µL)
10x High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen)	2.5
dNTPs (100 mM, chaque)	0.2
MgSO ₄ (50 mM)	1
primer 1 (200 µM concentration finale)	0.075
primer2 (200 µM concentration finale)	0.075
Matrice : Lysat de levures dilué	3 µL
ADN plasmidique	50 ng
Platinum <i>Taq</i> DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen Cat.No.11304-029)	0.2
ddH ₂ O	qsp 25 µL

Note : lorsque réalisée directement sur les levures, la PCR doit être précédée d'une lyse à la zymolase (voir le point 1.6)

1.1.2.2. Programme :

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées avec une machine MJ Research – PTC-225 Peltier Thermal Cycle, en suivant le programme suivant :

Étape	Température (°C)	Durée
1 Dénaturation de la matrice	94.0	2 min.
2 Dénaturation de la matrice	94.0	45 sec.
3 Hybridation spécifique des amorces	56.0	1 min.
4 Amplification	68.0	2 min.
5 Cycles	Retour à l'étape 2	30 fois
6 Amplification	68.0	5 min.
7 Fin	10.0	indéfiniment

1.1.3. Réactions GATEWAY™

1.1.3.1. Réaction BP

Protocole adapté de (Walhout *et al.*, 2000)

1. Réaliser les réactions sur glace
2. Dégeler la BP Clonase sur glace ; vortexer brièvement.
3. Combiner dans chaque puits d'une plaque 96-puits, et mélanger à la pipette :
 - 125 ng de vecteur donneur (pDONR223, carte ci-contre ; Rual *et al.*, 2004)
 - 5 µL de produits PCR
 - 5 µL de tampon de réaction : 5x BP Clonase™ reaction buffer, dans le Gateway® BP Clonase™ enzyme mix, Invitrogen Cat.No.11789-021
 - 1 µL de mix BP clonase (Int, IHF, et tampon de réaction) : Gateway® BP Clonase™ enzyme mix, Invitrogen Cat.No.11789-021
 - qsp 16 µL ddH₂O

Note : préparez un mélange général (sans produits PCR et en ajoutant l'enzyme en dernier lieu), et l'ajouter aux 5 µL de produits PCR précédemment distribués dans chaque puits.

4. Incuber sur la nuit à température ambiante.
5. Transformer 0.5 µL de chaque réaction dans 10 µL de bactéries CaCl₂ compétentes (Omnimax). Déposer 5 µL des bactéries transformées sur boîte LB + spectinomycine (50 µg/mL).

1.1.3.2. Réaction LR

Protocole adapté de (Walhout *et al.*, 2000) :

1. Réaliser les réactions sur glace
2. Dégeler la LR Clonase sur glace ; vortexer brièvement.
3. Combiner dans chaque puits d'un plaque 96-puits, et mélanger à la pipette :
 - 150 ng de vecteur de destination linéarisé (pDEST-AD ou pDEST-DB)
 - 3 µL de clone ENTRY (150ng par réaction)
 - 2 µL de tampon de réaction : 5x LR Clonase™ reaction buffer, dans le Gateway® LR Clonase™ enzyme mix, Invitrogen Cat.No.11791043
 - 2 µL de mix LR Clonase (Int, Xis, IHF) : Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix, Invitrogen Cat.No.11791043
 - qsp 10 µL ddH₂O

Note : préparez un mélange général (sans clones ENTRY et en ajoutant l'enzyme en dernier lieu), et l'ajouter aux 3µL de clones ENTRY précédemment distribués dans chaque puits.

4. Incuber sur la nuit à température ambiante
5. Transformer 0.5 µL de chaque réaction dans 10 µL de bactéries CaCl₂ compétentes. Déposer 5 µL des bactéries transformées sur boîte LB + ampicilline.

1.1.3.3. Miniprep

Les minipreps d'ADN plasmidique en plaque 96-puits ont été réalisées par un Qiagen 8000 Robot, selon les critères du fabricant.

Les autres minipreps ont été réalisées à l'aide du QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Cat.No.27104) et en suivant le protocole fourni par le fabricant.

1.1.4. Migration sur gel

Une électrophorèse sur gel d'agarose est systématiquement réalisée pour vérifier la présence et la taille des produits de PCR et de miniprep.

- Par puits : 5 µL d'ADN + 10 µL ddH₂O
- Marqueur de poids moléculaire : *E-Gel® 96 High Range DNA Marker*, Invitrogen Cat n°12352-019
- Matériel :

Gels précoulés	Matrice
E-Gel® 2% agarose, Invitrogen Cat n°G5018-02	E-Gel® PowerBase™ v.4, Invitrogen Cat.No.G6200-04
E-Gel® 2% agarose double comb, Invitrogen Cat.No.G6018-02	
E-Gel® 1% 96 Agarose, Invitrogen Cat.No.G7008-01	E-Gel® 96 Mother base, Invitrogen Cat.No. G7100-01

1.2. Transformations

1.2.1. Transformation de bactéries CaCl_2 compétentes

1. Par puits d'une plaque 96-puits :
 - 0.5 μL de produit de réaction BP ou LR
 - 10 μL de bactéries compétentes
2. 30 min. sur glace.
3. Choc thermique : bain-marie à 42°C pendant 1 minute.
4. Sur glace pendant 2 minutes.
5. Ajouter 100 μL de milieu S.O.C.
6. À 37°C pendant 1 heure.
7. Centrifuger (5 minutes à 2000 rpm).
8. Enlever 85 μL du surnageant.
9. Resuspendre.
10. Déposer 5 μL sur milieu LB (avec antibiotique approprié).
11. À 37°C sur la nuit.

1.2.2. Transformations de levures

Pour cent transformations (une plaque 96-puits) :

1. Prendre un patch de levure et inoculer 15 mL de YEPD. Faire croître sur la nuit à 30°C, sous forte agitation.
2. Mesurer la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ le lendemain matin.
3. Diluer jusqu'à une DO de 0.1 dans 50 mL.
4. Récupérer les 50 mL de cellules quand la DO se situe entre 0.4 et 0.6.
5. Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 min. à température ambiante.

NOTE : quand les levures sont presque prêtes à être récupérées :

- Faire bouillir du ssDNA (ADN de sperme de saumon, Sigma Cat.No.D-9156, 11.0 mg/mL) pendant 10 minutes, ensuite le placer directement sur glace
 - Aliquoter l'ADN dans une plaque Costar (300 ng/puits)
 - Prévoir de la place dans un bain à 42°C pour le choc thermique
6. Laver dans 40 mL de dH_2O , centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
 7. Laver dans 10 mL de LiAc/TE, centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
 8. Resuspendre les cellules dans 2 mL de LiAc/TE.
 9. Ajouter 200 μL d'ADN de sperme de saumon aux levures.
 10. Ajouter 10 mL de PEG LiAc/TE au mix de 2.2 mL de levures+ssDNA.
 11. Ajouter 122 μL du mix levures/ssDNA/PEG/LiAc/TE dans chaque puits contenant 3 μL d'ADN, bien mélanger.
 12. Après avoir scellé la plaque avec de l'aluminium et du parafilm, placer à 30°C pendant 30 min.
 13. Placer la plaque dans un bain à 42°C pendant 15 minutes pour le choc thermique.
 14. Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
 15. Éliminer le surnageant (PEG) à la pipette.
 16. Resuspendre le culot dans 100 μL de dH_2O .
 17. Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.

18. Éliminer 85 μL de dH_2O .
19. Resuspendre les cellules dans le volume de dH_2O restant.
20. Déposer 5 μL sur une boîte de milieu sélectif solide.

Les transformations simples ont été réalisées en suivant ce même protocole (1% des volumes utilisés).

1.3. Tests des interactions

1.3.1. Principe du double-hybride en levure

Pour bref rappel, le principe du double-hybride en levure (Fig. 1a) se base sur l'observation suivante : un facteur de transcription fonctionnel consiste en deux domaines séparables, un domaine de liaison à l'ADN (DB, DNA binding) et un domaine de transactivation (AD, activation domain). Dans le système double-hybride, ces deux domaines sont physiquement séparés et sont chacun fusionnés à une protéine d'intérêt (X et Y, respectivement). L'interaction physique entre DB-X et AD-Y peut reconstituer dans l'espace une structure protéique semblable à un facteur de transcription d'un gène rapporteur, lequel est soumis à une régulation par les sites de liaison à l'ADN de DB. Nous utilisons les DB et AD du facteur de transcription Gal4p de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression de DB-X et AD-Y est sous le contrôle d'un variant relativement faible du promoteur *ADHI*. Trois gènes rapporteurs, *GAL1::HIS3*, *GAL1::lacZ* et *SPAL10::URA3*, sont intégrés dans le génome de la souche de levure utilisée (MaV103). Ils contiennent des sites de liaison pour Gal4p dans leurs promoteurs. En général, une interaction en double-hybride est jugée positive quand l'expression d'au moins deux gènes rapporteurs est activée et quand le candidat positif en double-hybride est négatif lors d'un test d'auto-activation (c'est-à-dire de simple-hybride). Comme nous ne tenons compte pour les tests d'interaction que des gènes rapporteurs *HIS3* et *lacZ* (Fig. 1b), le critère retenu pour accepter une interaction est que les deux rapporteurs aient répondu positivement. En pratique, les levures sont d'abord transformées (voir protocole au point 1.2.2) avec le plasmide codant DB-X, puis co-transformées avec le plasmide codant AD-Y en format 96 puits, chaque puits correspondant à un fragment d'ORF (Y) fusionné à AD.

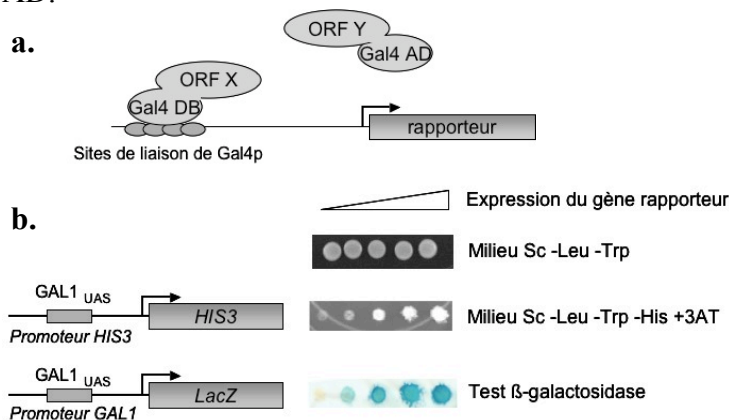


Fig. 1 : Principe du double-hybride en levure

- a. La reconstitution d'une structure simulant le facteur de transcription Gal4p, et l'activation de la transcription du gène rapporteur, nécessitent l'interaction physique entre les deux protéines de fusion. Dans notre cas, X représente CED-9, et Y un quelconque peptide issu du fragmentome de CED-4, F25F8.1 ou SPD-5.
- b. Les gènes rapporteurs utilisés permettent une sélection (test de croissance sur milieu sélectif) ou une visualisation (test colorimétrique, test β -galactosidase) des candidats où l'interaction entre DB-X et Y-AD s'est effectuée.

1.3.2. Test β -Galactosidase (Walhout *et al.*, 2001)

- Préparer un solution stock de tampon Z en dissolvant 16.1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ou 8.52 g anhydreux), 5.5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ou 4.8 g anhydreux), 0.75 g de KCl, 0.246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ou 0.12 g anhydreux) dans 1 L d'eau stérile, et ajuster le pH à 7.0.
- Répliquer les levures sur boîte YEPD avec filtre de nitrocellulose.
- Incuber sur la nuit à 30°C.
- Pour chaque plaque, placer deux filtres de papier Whatman (Whatman, Cat.No. 1454125) dans une boîte de Petri vide de 15 cm.
- Pour chaque plaque préparer 6mL de tampon Z, auquel on ajoute 11 μL de β -mercaptoéthanol et 100 μL de X-Gal 4% (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside, dissous dans du diméthylformamide).
- Verser ~ 200 mL d'azote liquide dans un seau à glace, placer sous hotte.
- Transférer le tampon Z dans le sboîtes de Petri contenant les papiers Whatman ; s'assurer que tout le papier est imprégnée et enlever les bulles d'air en soulevant les filtres à l'aide d'une pince à épiler.
- Avec une pince à épiler, saisir le filtre de nitrocellulose qui porte les levures, et le congeler pendant 10 secondes dans l'azote liquide.
- Dégeler à température ambiante tout en maintenant le filtre avec la pince à épiler.
- Placer délicatement le filtre sur le papier Whatman et enlever rapidement les bulles d'air.
- Incuber à 37°C ; observer régulièrement, et prendre des photos si nécessaire.
- Incuber sur la nuit à température ambiante, et observer le résultat. Différentes intensités de bleu indiquent différents niveaux d'activation du gène *LacZ*.

1.3.3. Test de croissance sur milieu Sc –Leu –Trp –His +3AT

Le milieu sélectif solide –Leu –Trp –His +3AT a été réalisé comme décrit (Walhout *et al.*, 2001) (3AT 20 mM, 1,2,4-triaminotriazole, approx. 95% TLC, SIGMA Cat.No.A8056-100G).

Deux répliques-nettoyage sur velours ont été réalisées pour chaque test sur 3AT, à partir des boîtes de milieu Sc –Leu –Trp portant les levures cotransformées.

L'observation de la croissance des levures sur Sc –Leu –Trp –His +3AT est possible en général après 2 à 3 jours d'incubation à 30°C.

1.3.4. Contrôles du double-hybride en levure

Les cinq contrôles utilisés sont les suivants :

- 1 : vecteurs AD & DB sans insert (contrôle négatif)
- 2 : exprime une interaction relativement faible (entre DB-Rb et AD-E2F)
- 3 : exprime une interaction relativement forte (entre DB-Fos et AD-Jun)
- 4 : Gal4p full length + vecteur AD sans insert
- 5 : exprime une interaction relativement forte (entre DB-DP et AD-E2F)

1.4. Crible double-hybride en levure

Jour 1 :

- Inoculer un « patch » de levures dans 25 mL de milieu YEPD
- Laisser pousser sur la nuit à 30°C.

Jour 2 :

- Prendre la D.O._{600nm}
- Diluer dans du milieu YEPD pour obtenir un volume final de 250 mL à une D.O. de 0.1
- Laisser croître à 30°C, et mesurer régulièrement la D.O. jusqu'à ce qu'elle soit comprise entre 0.4 et 0.6 (noter cette valeur). Pendant ce temps :
 - Faire bouillir du ssDNA pendant 10 min. et placer directement sur glace.
 - Préparer du TE/LiAc et du TE/LiAc/PEG (voir le point 1.2.2.)
- Centrifuger les levures à 2000 rpm à température ambiante, pendant 5 min.
- Resuspendre dans 50 mL de dH₂O à température ambiante.
- Centrifuger les levures à 2000 rpm à température ambiante pendant 5 min.
- Resuspendre dans 10 mL de TE/LiAc 1X à température ambiante.
- Centrifuger à nouveau.
- Resuspendre dans du TE/LiAc 1X, pour un volume final de 0.5 mL par 0.1 D.O.

Crible vs librairie d'ADNc	Crible vs AD-ORFeome
<ul style="list-style-type: none"> • Dans un falcon de 15 mL, mélanger : <ul style="list-style-type: none"> • 1.6 mL de levures • 160 µL de ssDNA • 20-30 µg de librairie d'ADNc • ajouter du PEG/TE/LiAc 1X jusqu'à un volume de 9 mL • Aliquoter les 9 mL dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, mélanger : <ul style="list-style-type: none"> • 160 µL de levures • 16 µL de ssDNA • 3 µg AD-ORFeome (1 µg/µL) • 720 µL de TE/LiAc/PEG

- Incuber tous les tubes Eppendorf à 30°C pendant 30 min.
- Incuber tous les tubes Eppendorf à 42°C pendant 15 min.
- Centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 15 sec.
- Resuspendre les culots dans 950 µL de dH₂O, et pooler les tubes ADNc.
- Ajouter 10 µL de chaque suspension à 10mL de dH₂O et étaler 300 µL de cette dilution 1:1000 sur boîte –Leu –Trp comme contrôle de transformation (efficience = nombre de colonies X 30000).
- Étaler 300µL des suspensions sur boîtes –Leu –Trp –His +20mM 3AT (27 boîtes ADNc et 3 boîtes ORFeome).

1.5. Séquençage

1.5.1. Purification des produits PCR

Les produits de réaction PCR à séquencer sont d'abord purifiés sur colonne à l'aide du QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Cat.No.28104), en suivant le protocole du fabricant (QIAquick® PCR Purification Kit Protocol with a microcentrifuge, QIAGEN).

1.5.2. Réactions de séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées par Agencourt® Bioscience Corporation.

Le séquençage des candidats du screen SPD-5-DMI-DB vs librairie de cDNA a été réalisé par Fish, DFCI Molecular Biology Core Facilities.

1.5.3. Analyse des séquences

Les alignements des traces de séquence ont été réalisés au moyen du programme SeqMan (DNASTar).

Les alignements de séquence et recherches d'homologie ont été réalisés avec le programme BLAST (BLASTn).

1.6. Lyse des levures

Solution de lyse à la zymolase : 2.5 mg/mL zymolase (Seikagaku Corp., Cat.No. 120491, 20.900 U/g) dans du tampon NaPO_4 0.1 M (pH=7.4).

- Lyser les levures dans 15 μL de solution de zymolase, placer ensuite à 37°C pendant 5 minutes, puis à 95°C pendant 5 minutes (MJ Research – PTC-225 Peltier Thermal Cycle).
- Diluer en ajoutant 100 μL de ddH₂O.
- Utiliser 3 μL du lysat pour la PCR.

2. Souches

2.1. Levures

Les deux souches utilisées sont isogéniques à part pour le mating type. Une souche, MaV103, est MATa, et l'autre, MaV203, est MAT α , ce qui permet des expériences de mating utilisant ces deux souches. MaV103 et MaV203 partagent le même génotype pour les caractéristiques double-hybride (*leu2-3, 112 trp-901 his3 Δ 200 ade2-1 gal4 Δ gal80 Δ SPAL10::URA3 GAL1::lacZ GAL1::HIS3@LYS2 can1R cyh2R*) (Walhout *et al.*, 2001).

2.2. Bactéries

One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R (Invitrogen) :

Génotype : F' {*proAB lacI^q lacZ Δ M15 Tn10(Tet^R) Δ (ccdAB)*} *mcrA Δ (mrr hsdRMS-mcrBC)* ϕ 80(*lacZ*) Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD*

3. Milieux

3.1. Milieux pour levures

Les milieux pour levures ont été réalisés comme décrit (Walhout *et al.*, 2001).

3.1.1. Milieux sélectifs

Préparation de 4 L de milieu synthétique complet (Sc) auquel il manque certains acides aminés ou nucléotides :

- Placer un barreau magnétique dans deux flasques de 2 L (flasques “milieu”)
- Dans un berlin de 2 L, mélanger 5.2 g de poudre d’acides aminés (-Trp, -His, -Leu, -Ura), 6.8 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) et 20 g de sulfate d’ammonium à 1900 mL d’eau.
- Ajuster le pH à 5.9 par addition de quelques gouttes de NaOH 10 M, et répartir dans les deux flasques.
- Ajouter 40 g d’agar à 950 mL d’eau dans 2 autres flasques (flasques “agar”).
- Autoclaver les 4 flasques pendant 45 minutes.
- Transférer le contenu de chaque flasque “milieu” dans une flasque “agar”.
- Placer au bain-marie à 55°C jusqu’à utilisation.
- Ajouter du glucose (concentration finale 2%).
- Ajouter chacun des acides aminés requis (8 mL/L).
- Couler le milieu dans des boîtes de Petri de 15 cm.

3.1.2. Milieux non sélectifs (YEPD : yeast extract bacto-peptone D-glucose)

3.1.2.1. Solide (2 L)

- Dans une flasque de 2 L, mélanger 20 g d’extrait de levure et 40 g de bacto-peptone à 950 mL d’eau. Ajouter un barreau magnétique.
- Dans une autre flasque de 2 L, ajouter 40 g d’agar à 950 mL d’eau.
- Autoclaver pendant 45 minutes.
- Mélanger le contenu des deux flasques dans la flasque “agar”.
- Placer au bain-marie à 55°C jusqu’à utilisation.
- Ajouter 100 mL de glucose 40% avant de couler le milieu dans des boîtes de Petri stériles de 15 cm.

3.1.2.2. Liquide (2 L)

- Mélanger 20 g d’extrait de levure et 40 g de bacto-peptone à 950 mL d’eau.
- Répartir dans 4 bouteilles de 500 mL et autoclaver pendant 45 minutes.
- Conserver à température ambiante
- Ajouter du glucose avant utilisation (50 mL de glucose 40% par litre).

3.2. Milieux pour bactéries

3.2.1. Milieu LB (Luria-Bertani)

4 capsules de LB (Q-BioGene, Bio101®Système, Cat.No.3002-046) pour 1 L de dH₂O. Ajouter 20 g d’agar pour un milieu solide. Autoclaver 45 minutes.

Formulation/L :

- 10 g Tryptone,
- 5 g d’extrait de levure,
- 10 g de NaCl

Au milieu solide ou liquide, ajouter un antibiotique si une sélection de bactéries transformantes est nécessaire :

Antibiotique	Concentration finale
Spectinomycine	50 µg/mL dans de l’EtOH 95%
Ampicilline	50 µg/mL dans ddH ₂ O

3.2.2. Milieu S.O.C. (Invitrogen, Cat.No.15544-034)

Composition pour 1L :

- 2% tryptone
- 0.5% extrait de levure
- 10 mM chlorure de sodium
- 2.5 mM chlorure de potassium
- 10 mM chlorure de magnésium
- 10 mM sulfate de magnésium
- 20 mM glucose

3.3. **Réactifs**

3.3.1. TE/LiAc

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.00)
- 1 mM EDTA
- 0.1 M acétate de lithium (LiAc)

3.3.2. PEG/TE/LiAc

- TE/LiAc
- 44% w/v polyéthylèneglycol 3350

3.3.3. Glucose 40% (w/v)

Dissoudre 400 g de glucose dans un volume final de 1 L.
Autoclaver 45 minutes.

3.3.4. Acides aminés

3.3.4.1. *Solutions concentrées d'acides aminés*

- 100 mM Histidine-HCl
- 20 mM Uracile
- 100 mM Leucine
- 40 mM Tryptophane (à conserver à 4°C et à l'abri de la lumière)

3.3.4.2. *Poudre d'acides aminés*

Mélanger 6 g de chacun des acides aminés suivants : alanine, arginine, acide aspartique, asparagine, cystéine, acide glutamique, glutamine, glycine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine. Ajouter 6 g de sulfate d'adénine. Les suivants sont donc omis (mais ajoutés au milieu en fonction de la sélection souhaitée) : tryptophane, histidine, uracile, leucine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aballay, A. & Ausubel, F.M. Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2735-2739 (2001).
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410 (1990).
3. Bornberg-Bauer, E., Beaussart, F., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. & Weiner, J., 3rd The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cell Mol Life Sci* **62**, 435-445 (2005).
4. Chen, F. et al. Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485-1489 (2000).
5. Conradt, B. & Horvitz, H.R. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-529 (1998).
6. Crick, F. Split genes and RNA splicing. *Science* **204**, 264-271 (1979).
7. Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219 (2004).
8. Delattre, M. et al. Centriolar SAS-5 is required for centrosome duplication in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **6**, 656-664 (2004).
9. Durrbaum-Landmann, I., Gercken, J., Flad, H.D. & Ernst, M. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* **64**, 5384-5389 (1996).
10. Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829 (1986).
11. Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* **112**, 591-603 (1991).
12. Ellis, R.E., Yuan, J.Y. & Horvitz, H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 663-698 (1991).
13. Fraser, H.B. Modularity and evolutionary constraint on proteins. *Nat Genet* **37**, 351-352 (2005).
14. Garcia-Martinez, V. et al. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**, 201-208 (1993).
15. Gilbert, W. DNA sequencing and gene structure. *Science* **214**, 1305-1312 (1981).
16. Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P. & Dornand, J. In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* **68**, 342-351 (2000).
17. Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H.R. & Hengartner, M.O. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* **126**, 1011-1022 (1999).
18. Hamill, D.R., Severson, A.F., Carter, J.C. & Bowerman, B. Centrosome maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Dev Cell* **3**, 673-684 (2002).
19. Han, J.D. et al. Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network. *Nature* **430**, 88-93 (2004).
20. Hartley, J.L., Temple, G.F. & Brasch, M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-1795 (2000).

21. Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S. & Murray, A.W. From molecular to modular cell biology. *Nature* **402**, C47-52 (1999).
22. Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499 (1992).
23. Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* **369**, 318-320 (1994).
24. Hofmann, E.R. et al. *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr Biol* **12**, 1908-1918 (2002).
25. Hofmann, K., Bucher, P. & Tschopp, J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**, 155-156 (1997).
26. Int.Hum.Gen.Seq.Consortium Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945 (2004).
27. Int.Hum.Gen.Seq.Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
28. Ito, T. et al. Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Mol Cell Proteomics* **1**, 561-566 (2002).
29. Kawarasaki, Y., Sasaki, Y., Ikeuchi, A., Yamamoto, S. & Yamane, T. A method for functional mapping of protein-protein binding domain by preferential amplification of the shortest amplicon using PCR. *Anal Biochem* **303**, 34-41 (2002).
30. Keane, J. et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* **65**, 298-304 (1997).
31. Li, S. et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-543 (2004).
32. Metzstein, M.M., Stanfield, G.M. & Horvitz, H.R. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* **14**, 410-416 (1998).
33. Moon, H.S., Bhak, J., Lee, K.H. & Lee, D. Architecture of basic building blocks in protein and domain structural interaction networks. *Bioinformatics* **21**, 1479-1486 (2005).
34. Otilie, S. et al. Mutational analysis of the interacting cell death regulators CED-9 and CED-4. *Cell Death Differ* **4**, 526-533 (1997).
35. Parrish, J., Metters, H., Chen, L. & Xue, D. Demonstration of the in vivo interaction of key cell death regulators by structure-based design of second-site suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11916-11921 (2000).
36. Reboul, J. et al. *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat Genet* **34**, 35-41 (2003).
37. Rowe, I. et al. Apoptosis of tail muscle during amphibian metamorphosis involves a caspase 9-dependent mechanism. *Dev Dyn* **233**, 76-87 (2005).
38. Rual, J.F. et al. Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. *Genome Res* **14**, 2128-2135 (2004).
39. Schedl, T. in *C. elegans*, Vol. II. (ed. B.T. Riddle D. L., Meyer Barbara J., Priess James R.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
40. Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S. & Gartner, A. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol* **11**, 1722-1727 (2001).
41. Schumacher, B. et al. *C. elegans* *ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **12**, 153-161 (2005).

42. Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D. & Metzenberg, R.L. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**, 905-916 (2001).
43. Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, R., Jenkinson, E.J. & Owen, J.J. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* **337**, 181-184 (1989).
44. Stergiou, L. & Hengartner, M.O. Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death Differ* **11**, 21-28 (2004).
45. Tewari, M. et al. Systematic interactome mapping and genetic perturbation analysis of a *C. elegans* TGF-beta signaling network. *Mol Cell* **13**, 469-482 (2004).
46. Uetz, P. & Finley, R.L., Jr. From protein networks to biological systems. *FEBS Lett* **579**, 1821-1827 (2005).
47. Vaux, D.L. CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* **90**, 389-390 (1997).
48. Venter, J.C. et al. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
49. Vidal, M. A biological atlas of functional maps. *Cell* **104**, 333-339 (2001).
50. Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. & Boeke, J.D. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10315-10320 (1996).
51. Walhout, A.J. et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* **328**, 575-592 (2000).
52. Walhout, A.J. & Vidal, M. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**, 297-306 (2001).
53. Woo, J.S. et al. Unique structural features of a BCL-2 family protein CED-9 and biophysical characterization of CED-9/EGL-1 interactions. *Cell Death Differ* **10**, 1310-1319 (2003).
54. Xiong, W. & Ferrell, J.E., Jr. A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature* **426**, 460-465 (2003).
55. Yan, N. et al. Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Mol Cell* **15**, 999-1006 (2004).
56. Yang, X., Chang, H.Y. & Baltimore, D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355-1357 (1998).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aballay, A. & Ausubel, F.M. Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2735-2739 (2001).
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410 (1990).
3. Bornberg-Bauer, E., Beaussart, F., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. & Weiner, J., 3rd The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cell Mol Life Sci* **62**, 435-445 (2005).
4. Chen, F. et al. Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485-1489 (2000).
5. Conradt, B. & Horvitz, H.R. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-529 (1998).
6. Crick, F. Split genes and RNA splicing. *Science* **204**, 264-271 (1979).
7. Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219 (2004).
8. Delattre, M. et al. Centriolar SAS-5 is required for centrosome duplication in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **6**, 656-664 (2004).
9. Durrbaum-Landmann, I., Gercken, J., Flad, H.D. & Ernst, M. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* **64**, 5384-5389 (1996).
10. Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829 (1986).
11. Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* **112**, 591-603 (1991).
12. Ellis, R.E., Yuan, J.Y. & Horvitz, H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 663-698 (1991).
13. Fraser, H.B. Modularity and evolutionary constraint on proteins. *Nat Genet* **37**, 351-352 (2005).
14. Garcia-Martinez, V. et al. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**, 201-208 (1993).
15. Gilbert, W. DNA sequencing and gene structure. *Science* **214**, 1305-1312 (1981).
16. Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P. & Dornand, J. In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* **68**, 342-351 (2000).
17. Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H.R. & Hengartner, M.O. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* **126**, 1011-1022 (1999).
18. Hamill, D.R., Severson, A.F., Carter, J.C. & Bowerman, B. Centrosome maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Dev Cell* **3**, 673-684 (2002).
19. Han, J.D. et al. Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network. *Nature* **430**, 88-93 (2004).
20. Hartley, J.L., Temple, G.F. & Brasch, M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-1795 (2000).

21. Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S. & Murray, A.W. From molecular to modular cell biology. *Nature* **402**, C47-52 (1999).
22. Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499 (1992).
23. Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. Activation of C. elegans cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* **369**, 318-320 (1994).
24. Hofmann, E.R. et al. Caenorhabditis elegans HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr Biol* **12**, 1908-1918 (2002).
25. Hofmann, K., Bucher, P. & Tschopp, J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**, 155-156 (1997).
26. Int.Hum.Gen.Seq.Consortium Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945 (2004).
27. Int.Hum.Gen.Seq.Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
28. Ito, T. et al. Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Mol Cell Proteomics* **1**, 561-566 (2002).
29. Kawarasaki, Y., Sasaki, Y., Ikeuchi, A., Yamamoto, S. & Yamane, T. A method for functional mapping of protein-protein binding domain by preferential amplification of the shortest amplicon using PCR. *Anal Biochem* **303**, 34-41 (2002).
30. Keane, J. et al. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* **65**, 298-304 (1997).
31. Li, S. et al. A map of the interactome network of the metazoan C. elegans. *Science* **303**, 540-543 (2004).
32. Metzstein, M.M., Stanfield, G.M. & Horvitz, H.R. Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. *Trends Genet* **14**, 410-416 (1998).
33. Moon, H.S., Bhak, J., Lee, K.H. & Lee, D. Architecture of basic building blocks in protein and domain structural interaction networks. *Bioinformatics* **21**, 1479-1486 (2005).
34. Otilie, S. et al. Mutational analysis of the interacting cell death regulators CED-9 and CED-4. *Cell Death Differ* **4**, 526-533 (1997).
35. Parrish, J., Metters, H., Chen, L. & Xue, D. Demonstration of the in vivo interaction of key cell death regulators by structure-based design of second-site suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11916-11921 (2000).
36. Reboul, J. et al. C. elegans ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat Genet* **34**, 35-41 (2003).
37. Rowe, I. et al. Apoptosis of tail muscle during amphibian metamorphosis involves a caspase 9-dependent mechanism. *Dev Dyn* **233**, 76-87 (2005).
38. Rual, J.F. et al. Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. *Genome Res* **14**, 2128-2135 (2004).
39. Schedl, T. in C. elegans, Vol. II. (ed. B.T. Riddle D. L., Meyer Barbara J., Priess James R.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
40. Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S. & Gartner, A. The C. elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol* **11**, 1722-1727 (2001).
41. Schumacher, B. et al. C. elegans ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **12**, 153-161 (2005).

42. Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D. & Metzenberg, R.L. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**, 905-916 (2001).
43. Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, R., Jenkinson, E.J. & Owen, J.J. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* **337**, 181-184 (1989).
44. Stergiou, L. & Hengartner, M.O. Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death Differ* **11**, 21-28 (2004).
45. Tewari, M. et al. Systematic interactome mapping and genetic perturbation analysis of a *C. elegans* TGF-beta signaling network. *Mol Cell* **13**, 469-482 (2004).
46. Uetz, P. & Finley, R.L., Jr. From protein networks to biological systems. *FEBS Lett* **579**, 1821-1827 (2005).
47. Vaux, D.L. CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* **90**, 389-390 (1997).
48. Venter, J.C. et al. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
49. Vidal, M. A biological atlas of functional maps. *Cell* **104**, 333-339 (2001).
50. Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. & Boeke, J.D. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10315-10320 (1996).
51. Walhout, A.J. et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* **328**, 575-592 (2000).
52. Walhout, A.J. & Vidal, M. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**, 297-306 (2001).
53. Woo, J.S. et al. Unique structural features of a BCL-2 family protein CED-9 and biophysical characterization of CED-9/EGL-1 interactions. *Cell Death Differ* **10**, 1310-1319 (2003).
54. Xiong, W. & Ferrell, J.E., Jr. A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature* **426**, 460-465 (2003).
55. Yan, N. et al. Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Mol Cell* **15**, 999-1006 (2004).
56. Yang, X., Chang, H.Y. & Baltimore, D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355-1357 (1998).